

특 2003-0036707

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.  
C12N 15/10

(11) 공개번호 특2003-0036707  
(43) 공개일자 2003년05월09일

(21) 출원번호 10-2003-7002397  
(22) 출원일자 2003년02월18일  
    번역문제출일자 2003년02월18일  
(86) 국제출원번호 PCT/JR2001/07139 (87) 국제공개번호 WO 2002/16639  
(86) 국제출원출원일자 2001년08월21일 (87) 국제공개일자 2002년02월28일  
(81) 지정국  
    국내특허 : 아랍에미리트 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아  
    아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질  
    벨라루스 캐나다 스위스 중국 코스타리카 쿠바 체코 독일 덴마크  
    도미니카연방 알제리 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그레나다 그루  
    지아 가나 감비아 크로아티아 헝가리 인도네시아 이스라엘 인도 아  
    미솔란드 일본 케냐 키르기즈 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스  
    리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 모로코  
    몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질  
    랜드 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로  
    베니아 슬로바키아 시에라리온 타지키스탄 투르크메니스탄 터키 트  
    리니다드토바고 탄자니아 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트  
    남 유고슬라비아 남아프리카 짐바브웨 안티구아바부다 벨리즈 볼리비  
    아 에쿠아도르 모잠비크 필리핀 AP-ARIPO특허 : 가나 감비아 케냐 레  
    소트 말라위 수단 시에라리온 스와질랜드 탄자니아 우간다 짐바브웨  
    모잠비크  
    EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐  
    스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄  
    EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 사이프러스 독일 덴마크 스  
    페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모  
    나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 터키  
    OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 몽고 코트디부아르 카  
    메룬 가봉 기네 기네비소 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고  
    적도기네

(30) 우선권 주장 JP-P-2000-00251981 2000년08월23일 일본 (JP)  
JP-P-2000-00284419 2000년09월19일 일본 (JP)  
JP-P-2000-00288750 2000년09월22일 일본 (JP)  
JP-P-2001-00104191 2001년04월03일 일본 (JP)  
(71) 출원인 다카라 바이오 가부시키가이샤  
일본 시가 520-2193 오츠키 세타 3초메 4-1  
(72) 발명자 사가와히로마키  
일본국시가525-0025구사츠시니시시부카와2-초메6-32  
우에모리다카시  
일본국시가520-2141오츠키시오메3-초메1-16샤루만코포다이니세타709  
무카미히로유키  
일본국시가524-0102모리마사미주호초마자미니카와1461-82  
마마모토준코  
일본국시가524-0044모리마사후타카초332-2  
도모노준  
일본국시가525-0025구사츠시니시시부카와2-초메12-1하모파레수-구사츠313  
고바야시에이지

일본국시가520-2153오츠시미치리야마6-초메18-19

에노키다츠지

일본국시가520-0865오츠시난고1-초메10-23이노우에하루수202

아사다기요조

일본국시가520-3333고카군고난초기보가오카3-20-9

가토이쿠노신

일본국교토611-0028우지시난료초1-1-150

최규팔, 이은선

(74) 대리인

심사결과 : 없음

**(54) 핵산 증폭 방법****요약**

3'-말단 또는 3'-말단측에 제공되는 리보뉴클레오타이드를 갖는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 엔도뉴클레아제 및 새 이중 합성을 갖는 DNA 폴리머라아제를 사용하여 샘플 중 표적 핵산을 고감도 및 특이적으로 증폭시키는 방법, 즉 핵산의 동온 및 (키메라성 프라이머-개시 증폭법(ICAN); 상기 방법을 사용하여 수득된 증폭 단편을 검출하는 방법; 상기 증폭 방법을 사용하여 표적 핵산을 제조하는 과정; 및 본 방법에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

**영세서****기술분야**

본 발명은 임상의학 분야에서 유용한 핵산을 검출하는 방법 및 유전공학 분야에서 유용한 DNA를 합성하는 방법에 관한 것이다. 주형으로서 핵산을 증폭시키는 방법 및 언급된 방법에 의해 증폭된 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

DNA 합성은 유전 공학분야의 연구에서 다양한 목적으로 사용된다. 올리고뉴클레오타이드와 같은 단쇄 DNA의 합성을 제외한 대부분의 DNA 합성은 DNA 폴리머라아제를 사용하는 효소적 방법에 의해 수행된다. 상기 방법의 예는 미국 특허 제 4,683,195 호, 제 4,683,202호, 및 4,800,159호에 상세히 기재된 종합효소 연쇄반응(PCR)이다. 또다른 예는 (Trends in Biotechnology, 10:146-152(1992))에 기재된, PCR 방법 및 역전사 효소 반응의 배합인 역전사-PCR 방법이다. 상기 언급된 방법의 개발에 의해 DNA 또는 RNA로부터 관심의 대상이 되는 영역을 증폭시킬 수 있었다.

상기 언급된 DNA 합성 방법은 예를 들면, 3단계로 구성된 반응에 의해 수행된다. 3단계는 더블-스트랜드 DNA를 싱글-스트랜드로 해리(변성)시키는 단계, 싱글-스트랜드에 프라이머를 어닐링하는 단계 및 프라이머로부터 상보적 스트랜드(complementary strand)를 합성(신장)시켜 관심의 대상이 되는 영역을 증폭시키는 단계이다. 또한, '셔틀 PCR(shuttle PCR)'로 명칭되는, 3단계중 2단계, 즉 동일한 온도에서 프라이머를 어닐링하는 단계 및 신장 단계를 수행하는 반응을 사용하여 그것을 수행한다('PCR methodology: Basic methodology and its application', Tanpakushitsu Kakusan Kouso, Bessatsu, (Protein, Nucleic Acid and Enzyme, Supplement), 41(5):425-428(1996)).

또한, 1989년 6월 14일에 공개된 유럽 특허 제 320,308 호에 기재된 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction(LCR)) 방법 또는 문헌(PCR Protocols, Academic Press Inc., 1990, pp.245-252)에 기재된 전사-기초 증폭 시스템(transcription-based amplification system(TAS))을 사용할 수 있다. 상기 언급된 4개의 방법은 다음 증폭 사이클을 위한 싱글-스트랜드 표적 분자를 재생시키기 위해 고온 및 저온에서 반응을 여러 차례 반복시키는 것을 필요로 한다. 상기 기재된 바와 같이 반응은 온도에 의해 제한되기 때문에 반응 시스템은 불연속 상 또는 사이클을 사용하여 수행되어야 한다.

따라서, 상기 방법들은 시간동안 광범위한 범위의 온도를 엄격히 조절할 수 있는 고가의 열 싸이클러(thermal cycler)의 사용을 필요로 한다. 또한, 반응은 두개 또는 3개의 예정된 것으로 온도를 조절하기 위한 시간을 필요로 한다. 사이클 수에 비례하여 낭비되는 시간은 증가한다.

상기 문제점을 해결하기 위해 등온에서 수행될 수 있는 핵산 증폭 방법이 개발되었다. 그의 예는 JP-8 7-114718호에 기재된 스트랜드 치환 증폭(SDA) 방법, 자립복제(self-sustained sequence replication(3SR)) 방법, 일본 특허 제 2650159 호에 기재된 핵산서열 기초 증폭(NASBA) 방법, 전사-매개 증폭(transcription-mediated amplification(TMA)) 방법, 일본 특허 제 2710159호에 기재된 Q $\beta$  레플리카아제(replicase) 방법 및 미국 특허 제 5,824,517 호, W0 99/09211, W0 95/25180 및 W0 99/49081에 기재된 다양한 개량 SDA 방법을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드의 등온 효소적 합성 방법은 미국 특허 제 5,916,777 호에 기재되어 있다. 등온 핵산 증폭 또는 올리고뉴클레오타이드의 합성 방법의 반응에서 프라이머로부터의 신장 및/또는 프라이머로부터의 신장전에 수행되는 프라이머의 싱글-스트랜드 신장 산물(원 표적 서열)에의 어닐링은 등온에서 인큐베이션된 반응 혼합물중에서 동시에 수행된다.

등온 핵산 증폭 방법중에서, SDA 방법이 DNA를 최종적으로 증폭시키는 시스템의 한 예이다. SDA 방법은

DNA 폴리머라제 및 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 더블 스트랜드를 치환하여 샘플 중에서 핵산 서열(및 그의 상보적 스트랜드)을 증폭시키는 방법이다. 상기 방법은 증폭용 4개의 프라이머를 필요로 하고, 이중 2개는 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위를 포함하도록 작제되어야 한다. 이 방법은 DNA를 대량으로 합성하기 위해 기질로서 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트의 사용을 필요로 한다. 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트의 예는  $\alpha$ -위치의 인산 그룹의 산소 원자가 황 원자(S)로 치환된( $\alpha$ -S) 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트이다. 예를 들면, 유전자 시퀀싱을 위해 상기 반응을 항상(routinely) 수행하는 경우, 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트의 사용과 관련된 러닝코스트(running cost) 문제는 심각하다. 또한, 예를 들면, 제한 효소 단편 장다형(restriction enzyme fragment length polymorphism(RELP)) 분석시, 본 발명에서( $\alpha$ -S) 데옥시리보뉴클레오타이드와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 증폭된 DNA 단편에 삽입시킴으로써 제한 효소를 사용하여 증폭된 DNA 단편을 절단하는 것을 생략할 수 있다.

미국 특허 제 5,824,517 호에 기재된 바와 같은 개량 SDA 방법은 RNA 및 DNA로 구성되고 필수 요소로서 DNA가 적어도 3'-말단에 위치한 구조를 갖는 키메라성 프라이머를 사용하는 DNA 증폭 방법이다. WO 99/09211에 기재된 바와 같은 개량 SDA 방법은 5'-팽창형의(Protruding) 단(end)을 제조하는 제한 효소의 사용을 필요로 한다. WO 95/251800에 기재된 개량된 SDA 방법은 적어도 두쌍의 프라이머의 사용을 필요로 한다. WO 99/49081에 기재된 개량된 SDA 방법은 적어도 2쌍의 프라이머 및 적어도 하나의 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트의 사용을 필요로 한다. 한편, 미국 특허 제 5,916,777호에 기재된 올리고뉴클레오타이드 합성 방법은 3'-말단에 리보뉴클레오타이드를 갖는 프라이머를 사용하여 DNA를 합성하고, 프라이머를 사용하여 반응을 종결시키고, 프라이머-신장된 스트랜드중의 프라이머 및 신장된 스트랜드 사이에 엔도뉴클레아제로 Nick(nick)을 삽입하여 그들을 분리하고, 주형을 분해하고 그것을 재사용하기 위해 프라이머를 회수하는 것을 포함한다. 본 발명에서 반응 시스템으로부터 프라이머를 분리한 후 그것을 주형에 다시 어닐링하여 프라이머를 재사용하는 것이 필요하다. 또한, WO 00/28028에 기재되어 있는 루프-매개 등온 증폭법(Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP))는 증폭을 위해 4개의 프라이머를 필요로 하고 상기 방법을 사용하여 증폭된 산물은 증폭을 위한 표적 부위가 반복된 다양한 크기를 갖는 DNA이다.

상기 기재된 바와 같이, 통상의 등온 핵산 증폭 방법은 여전히 다양한 문제를 갖고 있다. 따라서, 적은 운영비로 핵산을 증폭시키는 방법에 의해 추가로 유전공학적으로 DNA 단편을 수득하는 것이 요구되고 있다.

#### 발명의 목적

본 발명의 목적은 키메라 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 DNA 합성법에 의해 고감도로 샘플중 핵산을 특별하게 증폭시키는 핵산을 증폭시키는 방법, 상기 방법에 의해 수득한 증폭된 단편을 검출하는 방법, 상기 증폭법 및 이 방법을 위해 사용된 키메라 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 핵산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

#### 발명의 요약

집중적으로 연구한 결과, 본 발명자는 유전자 증폭 반응용의 우수한 시스템을 구축하였다. 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하는 리보뉴클레오타이드를 갖는 키메라 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 엔도뉴클레아제 및 DNA 폴리머라제의 존재에 관심의 대상이 되는 DNA 부위를 증폭시키는 방법을 개발하여 구축하였다. 따라서, 본 발명은 완성되었다. 본 방법은 키메라 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 사용되는 핵산을 증폭시키는 방법이고 본 명세서에서 ICAN(Isothermal and Chimeric primer-initiate Amplification of Nucleic acids) 방법으로 언급된다.

본 발명의 제 1면은

(a) 주형으로서 핵산, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, 스트랜드 치환 합성을 갖는 DNA 폴리머라제, 적어도 하나의 프라이머 및 RNase H를 혼합하여 반응 혼합물을 제조하고(여기에서 프라이머는 주형으로서 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 적어도 하나 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이다);

(b) 충분한 시간동안 반응 혼합물을 인큐베이션시켜 반응 산물을 생성시키는 것을 포함하는 핵산을 증폭시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제 2 면은

(a) 주형으로서 핵산을 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 적어도 하나의 프라이머 및 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고 더블-스트랜드 핵산을 합성하고(여기에서 프라이머는 주형으로서 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 적어도 하나 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이다);

(b) RNase H의 존재하에 스트랜드 치환 합성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 전 단계에서 수득된 주형으로서 더블-스트랜드 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시키고;

(c) 주형으로서 단계 (b)에서 수득한 더블-스트랜드 핵산을 단계(b)에서 다시 사용하는 것을 포함하는 핵산을 증폭시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제 3 면은

(a) 주형으로서 핵산을 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 적어도 하나의 프라이머 및 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고(여기에서 프라이머는 주형으로서 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 적어도

도 하나 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이다);

(b) RNase H의 존재하에 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 전 단계에서 수득된 주형으로서 더블-스트랜드 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 치환된 스트랜드 및 더블-스트랜드 핵산을 합성하고;

(c) 단계 (b)에서 수득한 더블-스트랜드 핵산을 단계(b)에서 다시 사용하고;

(d) 주형으로서 단계 (b)에서 수득한 치환된 스트랜드를 단계 (b)에서 사용된 것과 상이한 적어도 하나의 프라이머 및 DNA 폴리머라제로 처리하여 치환된 스트랜드에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고(여기에서 프라이머는 치환된 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 적어도 하나 포함하는 단계 (a)에서 사용된 것과 상이한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이다);

(e) RNase H의 존재하에 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 전 단계에서 수득된 주형으로서 더블-스트랜드 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 치환된 스트랜드 및 더블-스트랜드 핵산을 합성하고;

(f) 주형으로서 단계 (e)에서 수득한 더블-스트랜드 핵산을 단계 (e)에서 다시 사용하는 것을 포함하는 핵산을 증폭시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제 1 및 제 2 면에서, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 DNA 폴리머라제로 사용할 수 있다.

본 발명의 제 4 면은

(a) 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열과 실질적으로 상보적인 두개의 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고(여기에서 각 프라이머는 주형으로서 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 적어도 하나 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이다);

(b) 단계 (a)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 리보뉴클레오타이드를 포함하는 위치에서 엔도뉴클레아제로 절단하고;

(c) 단계 (b)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드가 절단된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 주형 및 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하는 것을 포함하는 것을 핵산 증폭 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제 5면은

(a) 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 두개의 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고, 여기에서 각 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하고;

(b) 단계 (a)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 사이트를 엔도뉴클레아제로 절단하고;

(c) 단계 (b)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드가 절단된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 서로 어닐링된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하는 것을 포함하는 것을 핵산 증폭 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제 6면은

(a) 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 두개의 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고, 여기에서 각 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하고;

(b) 단계 (a)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 사이트를 엔도뉴클레아제로 절단하고;

(c) 단계 (b)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드가 절단된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 주형 및 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산 및 단계 (a)의 두개의 프라이머가 어닐링된 서로 어닐링된 주형으로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고;

(d) 단계 (c)에서 수득한 두개의 프라이머가 어닐링된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을

신장시켜 스트랜드 치환시키고 서로 어닐링된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산 및 단계 (a)의 두개의 프라이머가 어닐링된 서로 어닐링된 주형으로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고;

(e) 단계 (d)에서 수득한 두개의 프라이머가 어닐링된 더블-스트랜드 핵산을 단계 (d)에서 다시 사용하는 것을 포함하는 핵산을 증폭시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제 7 면은

(a) 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 두개의 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고, 여기에서 각 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하고;

(b) 단계 (a)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 사이트를 엔도뉴클레아제로 절단하고;

(c) 단계 (b)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드가 절단된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 서로 어닐링된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산 및 단계 (a)의 두개의 프라이머가 어닐링된 서로 어닐링된 주형으로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고;

(d) 단계 (c)에서 수득한 두개의 프라이머가 어닐링된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 주형 및 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고;

(e) 단계 (d)에서 수득한 주형 및 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 사이트를 엔도뉴클레아제로 절단하고;

(f) 단계 (e)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드가 절단된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 치환된 스트랜드를 합성하는 것을 포함하는 핵산을 증폭시키는 방법에 관한 것이다.

제 4면 내지 제 7면에서, RNase H와 같은 엔도리보뉴클레아제가 엔도뉴클레아제로서 사용될 수 있다.

RNase H가 사용되는 제 1면 내지 제 7면에서, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 썬모토가(*Thermotoga*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 썬무스(*Thermus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 아키오클루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H 및 바실러스(*Bacillus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H가 사용될 수 있다.

제 1면 내지 제 7면에서, 표적 핵산의 뉴클레오타이드 서열내 증폭시키고자 하는 부위의 적절한 길이의 예는 200bp 이하이다.

본 발명의 제 1면 내지 제 7면에 대하여 하기 일반식으로 나타난 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 사용될 수 있다:

일반식: 5'-dNa-Nb-dNc-3'

(a: 11이상의 정수; b: 10이상의 정수; c: 0 또는 10이상의 정수; dN: 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체; N: 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 리보뉴클레오타이드, 여기에서, dNa중 일부의 dNs는 Ns로 대체될 수 있고, 3'-말단의 뉴클레오타이드는 DNA 폴리머라제의 작용에 의한 3'-말단으로부터의 신장이 발생하지 않도록 변형될 수 있다).

상기 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 c가 0인 프라이머 및 뉴클레오타이드 유사체가 데옥시리보이노신 뉴클레오타이드 또는 데옥시리보우라실 뉴클레오타이드이고 변형된 리보뉴클레오타이드가 ( $\alpha$ -S) 리보뉴클레오타이드인 프라이머가 예시된다. 또한, 상기 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 사용되는 경우 프라이머에 적절한 DNA 신장 반응 온도에서 DNA 신장 반응을 수행한다.

제 1면 내지 제 7면의 증폭 반응은 핵산이 프라이머에 어닐링하는 것을 촉진시키는 물질을 포함하는 어닐링 용액중에서 주형으로서 핵산을 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 어닐링시키는 것을 포함할 수 있다. 예로서, 어닐링 용액은 스퍼미딘 및/또는 포도 펠렌디아민을 포함할 수 있다. 주형으로서 핵산 및 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 어닐링 용액을 90°C 이상에서 인큐베이션시킨 후 증폭 반응을 수행하는 온도 이하로 용액을 냉각시켜 어닐링을 수행할 수 있다.

제 1면 내지 제 7면의 증폭 반응은 Bicine 및 HEPES로 구성된 그룹으로부터 선택되는 완충 성분을 포함하는 완충액중에서 수행할 수 있다.

제 1면 내지 제 7면에서, 예를 들면, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편, 바실러스 스테파로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bst DNA 폴리머라제 및 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 DNA 폴리머라제가 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로서 사용될 수 있다.

제 1면 내지 제 7면의 구체예로서, 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제가 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로서 사용되고 에스케리

키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H 또는 아키오클루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H가 엔도뉴클레아제로서 사용된다. RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H I형, 또는 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 또는 아키오클루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H II형으로 예시된다.

제 1면 내지 제 7면에서 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 사용될 수 있다. 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bca DNA 폴리머라제가 DNA 폴리머라제로서 사용될 수 있고 Bca DNA 폴리머라제가 Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질의 존재하에 증폭 반응을 수행할 수 있다. Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질은 망간 이온으로 예시된다.

제 1면 내지 제 7면의 표적 핵산 증폭 방법은 DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질의 존재하에 수행할 수 있다. DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질이 포스포노포름산에 의해 예시된다.

본 발명의 제 1면 내지 제 7면은 주형으로서 싱글-스트랜드 DNA 또는 더블-스트랜드 DNA를 사용하여 수행할 수 있다. 주형 핵산이 더블 스트랜드인 경우, 증폭 반응은 이를 싱글-스트랜드 DNAs로 전환시킨 후 수행할 수 있다.

주형으로서 핵산은 주형으로서 RNA를 사용하여 역전사 반응에 의해 수득된 cDNA일 수 있다. 일면으로, 증폭 반응을 주형으로서 RNA를 사용하여 역전사 반응에 의해 cDNA를 합성한 후 수행할 수 있다. 역전사 효소 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 역전사 효소로 사용할 수 있다. 예로서 역전사 반응 및 주형에 상보적인 신장된 스트랜드 합성을 역전사 효소 활성 및 스트랜드 치환 활성을 모두를 갖는 하나의 DNA 폴리머라제를 사용하여 수행할 수 있다. 상기 DNA 폴리머라제가 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bst DNA 폴리머라제 또는 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bca DNA 폴리머라제에 의해 예시된다.

제 1면 내지 제 7면에 있어서, 핵산 증폭 반응은 등온 조건하에 수행될 수 있다. 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체, 예로서, 데옥시우리딘 트리포스페이트 또는 그의 유도체의 존재하에 수행할 수 있다.

본 발명의 제 8면은

(a) 주형으로서 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 적어도 하나의 프라이머, 여기에서, 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하고;

(b) 엔도뉴클레아제; 및

(c) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하는 핵산을 증폭시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 제 9면은

(a) 주형으로서 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 적어도 두개의 프라이머, 여기에서, 각 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하고;

(b) 엔도뉴클레아제; 및

(c) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하는 핵산을 증폭시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 제 10면은 주형으로서 핵산, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제, 적어도 하나의 프라이머 (여기에서, 프라이머는 주형으로서 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 리보뉴클레오타이드, 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치한다) 및 엔도뉴클레아제를 혼합하여 수득된 핵산을 증폭시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 제 11면은 주형으로서 핵산, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제, 적어도 두개의 프라이머 (여기에서, 각 프라이머는 주형으로서 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치한다) 및 엔도뉴클레아제를 혼합하여 수득된 핵산을 증폭시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 제 8면 내지 제 11면의 조성물에 포함되는 프라이머는 하기 일반식으로 나타낸 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머로 예시된다:

일반식: 5'-dNa-Nb-dNc-3'

(a: 11이상의 정수; b: 10이상의 정수; c: 0 또는 10이상의 정수; dN: 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체; N: 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 리보뉴클레오타이드, 여기에서, dNa중 일부의 dNs는 Ns로 대체될 수 있고, 3'-말단의 뉴클레오타이드는 DNA 폴리머라제의 작용에 의한 3'-말단으로부터의 신장이 발생하지 않도록 변형될 수 있다).

상기 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 c가 0인 프라이머 및 뉴클레오타이드 유사체가 데옥시리보이

노신 뉴클레오타이드 또는 데옥시리보우라실 뉴클레오타이드이고 변형된 리보뉴클레오타이드가 ( $\alpha$ -S) 리보뉴클레오타이드인 프라이머로 예시된다.

제 8면 내지 제 11면의 조성물은 핵산 증폭 반응에 적절한 완충 성분을 포함할 수 있다. 예로서, Bicine 및 HEPES로 구성된 그룹으로부터 선택되는 완충 성분을 포함할 수 있다.

제 8면 내지 제 11면은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bst DNA 폴리머라제 및 바실러스 팔도테넥스(*Bacillus paltotenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 DNA 폴리머라제를 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로서 포함하는 조성물에 의해 예시된다.

일면에서, 제 8면 내지 제 11면의 조성물은 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로서 바실러스 팔도테넥스(*Bacillus paltotenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제 및 엔도뉴클레아제로서 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 또는 아키오클루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움을 포함한다.

제 8면 내지 제 11면의 조성물은 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함할 수 있다. DNA 폴리머라제로서 바실러스 팔도테넥스(*Bacillus paltotenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제가 사용될 수 있고 Bca DNA 폴리머라제가 Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질의 존재하에 사용될 수 있다. Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질은 망간 이온으로 예시된다.

제 8면 내지 제 11면의 조성물은 DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질을 포함하는 물질을 포함할 수 있다. DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질을 포함하는 물질은 포스포노포름산으로 예시된다. 또한, 조성물은 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체, 예로서 데옥시우리딘 트리포스페이트 또는 그의 유도체를 포함할 수 있다.

본 발명의 제 12면은

(a) RNase H; 및

(b) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하는 제 1면 내지 제 3면의 핵산을 증폭시키는 방법을 위해 사용되는 핵산을 증폭시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 제 13면은

(a) 엔도뉴클레아제; 및

(b) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하는 제 4면 내지 제 7면의 핵산을 증폭시키는 방법을 위해 사용되는 핵산을 증폭시키기 위한 조성물.

RNase H와 같은 엔도리보뉴클레아제가 제 13면의 조성물을 위해 엔도뉴클레아제로서 사용될 수 있다.

RNase H를 포함하는 제 12면 또는 제 13면의 조성물을 위한 RNase H로서 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 썬모토가(*Thermotoga*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 썬무스(*Thermus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 아키오클루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H 및 바실러스(*Bacillus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 RNase H를 포함할 수 있다.

제 12면 또는 제 13면의 조성물은 추가로 핵산 증폭 반응에 적절한 완충 성분을 포함할 수 있다. 예로서 Bicine 및 HEPES로 구성된 그룹으로부터 선택되는 완충 성분을 포함할 수 있다.

제 12면 또는 제 13면은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bst DNA 폴리머라제 및 바실러스 팔도테넥스(*Bacillus paltotenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 DNA 폴리머라제를 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로서 포함하는 조성물에 의해 예시된다. RNase H와 같은 엔도리보뉴클레아제를 엔도뉴클레아제로서 사용할 수 있다. RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 썬모토가(*Thermotoga*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 썬무스(*Thermus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 아키오클루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H에 의해 예시된다.

일면에서, 제 12면 또는 제 13면의 조성물은 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로서 바실러스 팔도테넥스(*Bacillus paltotenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제 및 엔도뉴클레아제로서 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 또는 아키오클루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H를 포함할 수 있다. RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H I형, 또는 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 또는 아키오클루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H II형으로 예시된다.

제 12면 또는 제 13면의 조성물은 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함할 수 있다. DNA 폴리머라제로서 바실러스 팔도테넥스(*Bacillus paltotenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제가 사용될 수 있고 이는 Bca DNA 폴리머라제가 Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질의 존재하에 사용될 수 있다. Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질은 망간 이온에 의해 예시된다.

제 12면 또는 제 13면의 조성물은 DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질을 포함하는 물질을 포함할 수 있다. DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질을 포함하는 물질은 포스포노포름산에 의해 예시된다. 또한, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체, 예로서 데옥시우리딘 트리포스페이트

또는 그의 유도체를 포함할 수 있다.

본 발명의 제 14면은

(a) RNase H; 및

(b) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하고, 제 1면 내지 제 3면의 핵산을 증폭시키기 위한 방법에서 사용되는 핵산을 증폭시키기 위한 키트에 관한 것이다.

본 발명의 제 15면은

(a) 엔도뉴클레아제; 및

(b) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하고, 제 4면 내지 제 7면의 핵산을 증폭시키기 위한 방법에서 사용되는 핵산을 증폭시키기 위한 키트에 관한 것이다.

RNase H와 같은 엔도리보뉴클레아제를 제 15면의 키트를 위한 엔도뉴클레아제로서 사용할 수 있다.

RNase H를 포함하는 제 14면 또는 제 15면의 키트는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 썬모토가(*Thermotoga*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 썬무스(*Thermus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 아키오글루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H 및 바실러스(*Bacillus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 RNase H를 포함하는 키트에 의해 예시된다.

제 14면 또는 제 15면의 키트는 핵산 증폭 반응에 적절한 완충 성분을 포함할 수 있다. 예로서, 조성물은 Bicine 및 HEPES로 구성된 그룹으로부터 선택되는 완충 성분을 포함할 수 있다. 키트는 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 프라이머에 주형으로서의 핵산이 어닐링하는 것을 촉진시키는 물질을 포함하는 어닐링 용액을 포함할 수 있다. 예로서, 어닐링 용액은 스퍼미딘 및/또는 프로필렌디아민을 포함할 수 있다.

본 발명의 제 14면 또는 제 15면의 키트에 포함되는 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bst DNA 폴리머라제 및 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bca DNA 폴리머라제로 예시된다.

일면에서, 제 14면 또는 제 15면의 키트는 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bca DNA 폴리머라제 및 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움 또는 아키오글루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H를 포함한다. RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H I형, 또는 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 또는 아키오글루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H II형으로 예시된다.

제 14면 또는 제 15면의 키트는 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함할 수 있다. DNA 폴리머라제로서 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bca DNA 폴리머라제가 사용될 수 있고 이는 Bca DNA 폴리머라제가 Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질의 존재하에 사용될 수 있다. Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질은 당간 이론에 의해 예시된다.

제 14면 또는 제 15면의 키트는 DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질을 포함하는 물질을 포함할 수 있다. DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질을 포함하는 물질은 포스포노포름산에 의해 예시된다. 또한, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체, 예로서 데옥시우리딘 트리포스페이트 또는 그의 유도체를 포함할 수 있다.

본 발명의 제 16면은 패키지 형태(packaged form)이고 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제 및 RNase H의 사용을 지시하는 안내서를 포함하는, 제 1면 내지 제 3면의 핵산 증폭 방법을 위해 사용되는 핵산 증폭용 키트에 관한 것이다.

본 발명의 제 17면은 패키지 형태이고 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제 및 엔도뉴클레아제의 사용을 지시하는 안내서를 포함하는, 제 4면 내지 제 7면의 핵산 증폭 방법을 위해 사용되는 핵산 증폭용 키트에 관한 것이다.

본 발명의 18면은 포장재 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제 및/또는 RNase H를 포함하는 포장재에 동봉된 핵산을 증폭시키기 위한 시약으로 구성되고, 핵산을 증폭시키기 위한 시약을 등온 조건하에서의 핵산 증폭을 위해 사용할 수 있다는 설명이 포장재에 부착된 라벨 또는 포장재에 첨부된 안내서에 표시된 핵산 증폭을 위한 시약 제품에 관한 것이다.

본 발명의 제 19면은 포장재 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제 및/또는 엔도뉴클레아제를 포함하는 포장재에 동봉된 핵산을 증폭시키기 위한 시약으로 구성되고, 핵산을 증폭시키기 위한 시약을 등온 조건하에서의 핵산 증폭을 위해 사용할 수 있다는 설명이 포장재에 부착된 라벨 또는 포장재에 첨부된 안내서에 표시된 핵산 증폭을 위한 시약 제품에 관한 것이다.

본 발명의 제 20면은

(a) 본 발명의 제 1면 내지 제 7면의 핵산 증폭 방법에 의해 핵산을 증폭시키고;

(b) 단계 (a)에서 증폭된 표적 핵산을 검출하는 것을 포함하는, 샘플중 표적 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제 20면의 검출 방법은 검출용 프로브를 사용하여 증폭된 핵산을 검출하는 것을 포함할 수 있다. 프로브는 검출용 프로브가 표지화 물질로 표지된 프로브일 수 있다. 예로서, 프로브가 소량 상태에



이르게 하는 거리에 위치하는 두개 이상의 형광 물질로 표시된 RNA 프로브가 사용될 수 있다.

본 발명의 제 21면은 제 20면에 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 관한 것이다. 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 하기 일반식으로 나타낸 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머로 예시된다:

일반식: 5'-dNa-Nb-dNc-3'

(a: 11이상의 정수; b: 10이상의 정수; c: 0 또는 10이상의 정수; dN: 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체; N: 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 리보뉴클레오타이드, 여기에서, dNa중 일부의 dNs는 Ns로 대체될 수 있고, 3'-말단의 뉴클레오타이드는 DNA 폴리머라제의 작용에 의한 3'-말단으로부터의 신장이 발생하지 않도록 변형될 수 있다).

상기 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 c가 0인 프라이머 및 뉴클레오타이드 유사체가 데옥시리보노신 뉴클레오타이드 또는 데옥시리보우라실 뉴클레오타이드이고 변형된 리보뉴클레오타이드가 ( $\alpha$ -S) 리보뉴클레오타이드인 프라이머로 예시된다.

본 발명의 제 21면의 프라이머는 병원성 미생물 또는 질환-관련 유전자 검출을 위한 프라이머로 예시된다. 병원성 미생물, 예로서, 장형성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 마이코박테리움 튜버큐로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 인간 유두종 바이러스(human papilloma virus), C형 간염 바이러스 또는 비로이드를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 본 발명에 포함된다.

본 발명의 제 22면은 서열번호 31-34, 47, 48, 51-53, 64-72, 84, 85, 113, 114, 130 및 131로 구성된 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 장형성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 관한 것이다.

본 발명의 제 23면은 서열번호 59, 60, 119, 120, 122 및 123로 구성된 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 비로이드를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 관한 것이다.

본 발명의 제 24면은 서열번호 116 또는 117로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)을 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 관한 것이다.

본 발명의 제 25면은 서열번호 96 또는 97로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 인간 유두종 바이러스를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 관한 것이다.

본 발명의 제 26면은 서열번호 101, 102, 138, 139, 200 및 201로 구성된 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 C형 간염 바이러스를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 관한 것이다.

본 발명의 제 27면은 서열번호 136 또는 137로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 관한 것이다.

본 발명의 제 28면은 서열번호 155, 156, 159-162, 194 및 195로 구성된 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 마이코박테리움 튜버큐로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 관한 것이다.

본 발명의 제 29면은 서열번호 157 또는 158로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 클라미디아(*Chlamydia*)를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 관한 것이다.

본 발명의 제 30면은 본 발명의 제 21면 내지 제 29면의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는, 제 1면 내지 제 15면의 핵산을 증폭하는 방법에서 사용되는 핵산 증폭용 키트에 관한 것이다.

본 발명의 제 31면은 본 발명의 제 21면 내지 제 29면의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는, 본 발명의 제 20면의 표적 핵산을 검출하는 방법에서 사용되는 핵산 검출용 키트에 관한 것이다.

본 발명의 제 32면은 제 20면의 방법에서 사용되는 프로브에 관한 것이다.

본 발명의 제 33면은 제 1면 내지 제 7면의 방법에 의해 증폭된 핵산에 하이브리드화되는 프로브에 관한 것이다.

본 발명의 제 34면은 제 21면 내지 제 29면의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 증폭된 부위에 하이브리드화되는 프로브에 관한 것이다.

제 32면 내지 제 34면의 프로브는 표지 물질로 표시된 프로브일 수 있고, 예로서, 소광 상태에 이르게 하는 거리에 위치하는 두개 이상의 형광 물질로 표시된 RNA 프로브일 수 있다.

본 발명의 제 35면은 제 32면 내지 제 34면의 프로브를 포함하고 제 20면의 방법에서 표적 핵산을 검출하기 위하여 사용되는 키트에 관한 것이다.

본 발명의 제 36면은 스트랜드 치환 합성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형 스위치 반응을 시키는 것을 포함하는, 핵산 증폭 방법에 관한 것이다.

제 36면에서 사용되는 스트랜드 치환 합성을 갖는 DNA 폴리머라제는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편, 바실러스 스테아로테르모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bst DNA 폴리머라제 및 바실러스 팔도테넥스(*Bacillus padothensis*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bca DNA 폴리머라제에 의해 예시된다.

본 발명의 제 37면은

(a) 제 1면 내지 제 7면의 핵산 증폭 방법에 의해 고정화하고자 하는 핵산을 증폭시키고;

(b) 단계 (a)에서 증폭된 핵산을 미리 정해진 영역에 배열하고 고정화시키는 것을 포함하는, 핵산이 미리 정해진 영역에 배열된, 고정화된 핵산을 갖는 물질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제 38면은 제 37면의 방법에 의해 제조되는 핵산이 미리 정해진 영역에 배열된, 고정화된 핵산을 갖는 물질에 관한 것이다.

본 발명의 제 39면은

(a) 제 1면 내지 제 7면의 핵산 증폭 방법에 의해 핵산을 증폭시키고;

(b) 단계 (a)에서 증폭된 핵산을 모으는하는 것을 포함하는, 핵산을 대량으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제 40면은

(a) 증폭시키고자 하는 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA를 복제하여 주형으로서 핵산을 제조하고;

(b) 제 1면 내지 제 7면의 핵산 증폭 방법에 의해 단계 (a)에서 수득한 주형으로서 핵산을 증폭시키는 것을 포함하는 핵산 증폭 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제 41면은 제 1면 내지 제 7면, 제 39면 또는 제 40면의 방법에 따라 핵산을 증폭시키는 것을 포함하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열 결정 방법에 관한 것이다.

#### 도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 3은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 4은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 6은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 7은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 8은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 9은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 10은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다. A: ICAN, B: PCR.

도 11는 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 12은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 13은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 14는 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 15은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 16은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 17는 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 18은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 19은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 20는 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 21은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 22은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 23는 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 24은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 25은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 26는 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 27은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 28은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 29는 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

도 30는 본 발명의 방법 및 PCR에 따라 증폭된 증폭 산물의 양을 비교한 그래프이다.

- 도 31은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.  
 도 32는 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.  
 도 33은 본 발명의 핵산을 증폭시키는 방법의 일면을 나타낸다.  
 도 34은 본 발명의 핵산을 증폭시키는 방법의 일면을 나타낸다.  
 도 35은 본 발명의 핵산을 증폭시키는 방법의 일면을 나타낸다.  
 도 36은 본 발명의 핵산을 증폭시키는 방법의 일면을 나타낸다.  
 도 37은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.  
 도 38은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.  
 도 39은 본 발명의 방법에 따라 증폭된 증폭 DNA 단편의 아가로스 겔 전기영동 패턴을 나타낸다.

#### 발명의 상세한 설명

본 명세서에서 사용되는 바, 데옥시리보뉴클레오타이드(또한 dN으로서 언급됨)는 당 부위가 D-2-데옥시리보오스로 구성된 뉴클레오타이드를 언급한다. 예를 들면, 데옥시리보뉴클레오타이드는 염기 부위로서 아데닌, 사이토신, 구아닌 또는 티민을 갖는 것들을 포함한다. 추가로, 데옥시리보뉴클레오타이드는 또한 7-데마자 구아노신과 같이 변형된 염기를 갖는 데옥시리보뉴클레오타이드 및 데옥시이노신 뉴클레오타이드와 같은 데옥시리보뉴클레오타이드 유사체를 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 바, 리보뉴클레오타이드(또한 N으로서 언급됨)는 당 부위가 D-리보오스로 구성된 뉴클레오타이드를 언급한다. 예를 들면, 데옥시리보뉴클레오타이드는 염기 부위로서 아데닌, 사이토신, 구아닌 또는 우라실 갖는 것들을 포함한다. 또한 리보뉴클레오타이드는  $\alpha$ -위치의 인산 그룹의 산소 원자가 황 원자로 치환된(또한 (  $\alpha$ -S)로서 언급됨) 변형된 리보뉴클레오타이드와 같은 변형된 리보뉴클레오타이드 또는 다른 유도체를 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 바, 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 데옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 프라이머를 언급한다. 프라이머는 리보뉴클레오타이드 유사체 및/또는 변형된 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하는 리보뉴클레오타이드를 갖고, 본 발명의 방법에서 핵산 스트랜드를 신장시키기 위하여 사용할 수 있고, 엔도뉴클레아제로 절단될 수 있고, 스트랜드 치환 반응을 위해 사용될 수 있는 어느 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 바, 3'-말단측은 예를 들면, 프라이머와 같이 핵산의 중심으로부터 3'-말단까지의 부위를 언급한다. 또한, 5'-말단측은 핵산의 중심으로부터 5'-말단까지의 부위를 언급한다.

본 명세서에서 사용되는 바, 엔도뉴클레아제는 주형으로서 핵산에 어닐링된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머로부터 DNA를 신장시켜 제조된 더블-스트랜드 DNA에 작용하고, 특히 리보뉴클레오타이드를 포함하는 프라이머의 부위에서 그것을 절단하는 어느 것일 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 바, DNA 폴리머라제는 주형으로서 DNA 스트랜드를 사용하여 새롭게 DNA 스트랜드를 합성하는 효소를 언급한다. DNA 폴리머라제는 자연발생적 DNA 폴리머라제 및 상기 언급한 활성을 갖는 변이체 효소를 포함한다. 예를 들면, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제, 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성이 결합된 DNA 폴리머라제 및 역전사효소 활성을 갖거나 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 바, '스트랜드 치환 활성'은 스트랜드를 치환할 수 있는 합성, 즉, DNA 스트랜드를 치환하여 주형 스트랜드에 어닐링된 상보적인 스트랜드를 분리시키면서 주형으로 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 DNA를 복제할 수 있는 활성을 언급한다. 또한, 본 명세서에서 스트랜드 치환으로부터 수득한 주형으로서 뉴클레오타이드 서열로부터 분리된 DNA 스트랜드를 '치환된 스트랜드'로서 언급한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명할 것이다.

#### (1) 본 발명에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머

본 발명의 방법에서 사용되는 프라이머는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이다. 그러한 프라이머는 또한 변형되지 않는 리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 리보뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머이다.

본 발명의 방법에서 사용되는 키메라성 프라이머는 주형으로서 핵산의 일부의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이다. 사용되는 조건하에서 DNA 스트랜드를 신장시킬 수 있다. 또한, 리보뉴클레오타이드는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치한다. 프라이머는 일반적으로 증폭되는 영역의 상류, 즉, 주형으로서 핵산중에 증폭되는 부위에 대응하는 뉴클레오타이드 서열의 3' 부위에 상보적으로 작제된다. 본 명세서에서 사용되는 바, '실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열'은 사용되는 반응 조건하에서 주형으로서 DNA에 어닐링할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.

그러한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 또는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 공지된 방법, 예를 들면, Labo Manual PCR(Takara Shuzo, pp.13-16, 1996)를 참고하여 디자인할 수 있다. OLIGO<sup>®</sup> 프라이머 어닐리시스 소프트웨어(Takara Shuzo)와 같은 프라이머 작제용의 시판되는 소프트웨어를 사용할 수 있다.

본 발명의 방법에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 하나 이상의 변형된 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바, 리보뉴클레오타이드는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치할 수 있고 엔도뉴클레아제에 의해 인식되거나 절단되는 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 또는 변형된 리보뉴클레오타이드 중 어느 하나일 수 있다. 리보뉴클레오타이드는 상기 언급된 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 및 변형된 리보뉴클레오타이드 둘 모두를 포함할 수 있다. 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드, 변형된 리보뉴클레오타이드 또는 그의 혼합물이 프라이머의 기능을 없애지 않는 한 본 발명의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 위해 사용할 수 있다. 변형된 리보뉴클레오타이드의 예로는 제한되는 것은 아니지만, 인산 그룹에 결합된 산소원자가 황 원자로 치환된 ( $\alpha$ -S) 리보뉴클레오타이드, 및 리보오스의 2번-위치에 하이드록시 그룹이 메톡시 그룹으로 치환된 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 변형된 리보뉴클레오타이드를 포함하는 그러한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 예를 들면, 황화 반응제(Glen Research), 또는 2-OMe-RNA-CE 포스포로아미다이트제(Glen Research)를 사용하는 방법에 의해 제조된 ( $\alpha$ -S) 리보뉴클레오타이드를 사용하여 제조할 수 있다.

본 발명의 종속 방법에서 사용될 수 있는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 엔도뉴클레아제를 사용하는 절단에 대하여 내성을 갖도록 하기 위해 변형된 리보뉴클레오타이드를 포함하도록 디자인될 수 있다. 그러한 프라이머는 종속 반응 단계동안 그것이 엔도뉴클레아제로 절단 부위를 조정할 수 있게 하는 데 유용하다.

하나 이상의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 종속 후 원하는 형태의 DNA 단편(싱글-스트랜드 또는 더블-스트랜드)에 따라 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 특히, 싱글-스트랜드 DNA가 필요한 경우, 하나의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하고, 더블-스트랜드 DNA가 필요한 경우, 두개의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용한다.

본 발명의 방법에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 길이는 특별히 제한되는 것은 아니지만, 바람직하게 약 12 뉴클레오타이드 내지 약 100 뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게 약 15뉴클레오타이드 내지 약 40뉴클레오타이드이다. 키메라성 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열이 사용되는 반응 조건하에서 주형으로서 핵산에 어닐링할 수 있도록 실질적으로 주형으로서 핵산과 상보적인 것이 바람직할 수 있다. 프라이머는 하기에 기재된 단계에서 사용되는 엔도뉴클레아제에 의해 3'-말단 또는 3'-말단측에서 인식되는 서열을 포함한다.

예를 들면, 하기 일반식으로 표시되는 구조를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 본 발명의 DNA 합성 방법에서 프라이머로서 사용할 있지만, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다:

일반식 : 5'-dN<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-dN<sub>3</sub>'

(a: 11이상의 정수이고; b: 0 또는 1이상의 정수이며 c: 0 또는 1이상의 정수이고(단, b 및 c는 동시에 0 이 아니다); dN: 대옥시리보뉴클레오타이드이며; N: 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 리보뉴클레오타이드이다(여기에서, dN을 dNs는 Ns에 의해 치환될 수 있고, 3'-말단의 뉴클레오타이드는 DNA 폴리머라제의 작용에 의한 3'-말단으로부터의 신장을 발생하지 않도록 변형될 수 있다).

예를 들면, a가 11이상의 정수이고; b가 1이며; c가 0-5인 일반식으로 표시되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 본 발명에서 바람직하게 사용할 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 리보뉴클레오타이드의 길이는 바람직하게 1-mer 내지 15-mer, 더욱 바람직하게 1-mer 내지 10-mer, 가장 바람직하게 1-mer 내지 5-mer이다. 일반식에서 c의 수는 특정하게 제한되는 것은 아니지만, 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 어느 수가 선택될 수 있다. 일반적으로, 50이하가 바람직하다. c에 대하여 4보다 3, 3보다 2, 2보다 1을 선택한 반응에서 더욱 우수한 결과를 수득하였다. 특히, c가 0인 경우 가장 효과적인 반응을 수행할 수 있었다.

본 발명에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 엔도뉴클레아제가 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하는 리보뉴클레오타이드를 포함하는 위치에서 DNA 폴리머라제(프라이머-신장된 스트랜드)를 사용하여 프라이머로부터 신장된 DNA 스트랜드를 인식하거나 절단하는 구조를 갖는다. 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니지만 예를 들면, 주형으로서 핵산에 어닐링된 일반식에 의해 표시된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머로부터 DNA 신장에 의해 제조된 더블-스트랜드 DNA에 RAAS H를 작용시키는 경우, 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 리보뉴클레오타이드 부위에서 절단된다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 신장에 의해 합성된 DNA 스트랜드 사이에 Nick(nick)이 삽입된 더블-스트랜드가 제조된다. 이어서, Nick 부위로부터 DNA 폴리머라제로 스트랜드 치환 반응을 수행한다. 따라서, 프라이머의 3'-말단으로부터 핵산 스트랜드를 신장시키기 위해 사용될 수 있고, 엔도뉴클레아제로 절단될 수 있고, 그것과 함께 DNA 폴리머라제로 스트랜드 치환시킬 수 있는 어느 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 본 발명의 방법에서 사용할 수 있다. 추가로, 본 발명의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 3'-말단이 DNA 폴리머라제에 작용에 의한 신장이 발생하지 않고 DNA 신장은 엔도뉴클레아제에 의한 절단시 생성된 3'-말단으로부터 발생하는 것을 포함한다.

추가로, RNA 폴리머라제에 대한 프로모터 서열은 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 5'-말단측상에 포함될 수 있다. 그러한 RNA 폴리머라제는 T7 RNA 폴리머라제 및 SP6 RNA 폴리머라제에 의해 예시된다.

또한, 본 발명의 방법에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 뉴클레오타이드 유사체 또는 다른 물질들을 포함할 수 있다. 즉, 하나 이상의 뉴클레오타이드(들)은 DNA 폴리머라제의 작용에 의해 3'-말단으로부터의 중합 신장 반응시키는 프라이머의 작용이 제거되지 않는 한 본 발명의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 포함될 수 있다. 여러 형태의 뉴클레오타이드 유사체가 배합되어 사용될 수 있다. 제한하는 것은 아니지만, 뉴클레오타이드 유사체의 예로 데옥시이노신 뉴클레오타이드, 데옥시우라실 뉴클레오타이드, 7-데아자구아닌과 같이 변형된 염기를 갖는 뉴클레오타이드 유사체, 리보스 유사체를 갖는 뉴클레오타이드 유사체 등을 포함한다. 또한 본 발명에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 데옥시 뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 또는 상기 기술된 작용을 갖는 한 표시된 화합물을 추가하는 것과 같은 다양한 변형을 갖는 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다.

뉴클레오타이드 유사체를 프라이머내로 삽입하는 것이 프라이머 자체의 고차 구조 형성을 억제하고 주형과

의 어닐링 형성을 안정화시키는데 유효하다. 리보뉴클레오타이드를 동일한 방법으로 프라이머 내로 삽입할 수 있다. 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니지만, ( $\alpha$ -S) 리보뉴클레오타이드와 같이 변형된 리보뉴클레오타이드를 바람직하게 사용하여 비-특이 엔도뉴클레아제(RNase)에 의한 프라이머의 분해를 방지할 수 있다.

예를 들면, 포스포리미다이트 방법에 따라 어플라이드 바이오시스템사(Applied Biosystems Inc. (ABI))의 394형 DNA 합성기를 사용하여 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 어느 뉴클레오타이드 서열을 갖도록 합성할 수 있다. 또한, 포스포이트 트리에스테르 방법, H-포스포네이트 방법 및 티오포스포네이트 방법을 사용하여 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 합성할 수 있다.

### (2) 본 발명에서 사용되는 엔도뉴클레아제

상기 (1)에 기재된 바와 같은 주형으로서 핵산에 어닐링되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머로부터 DNA 신장에 의해 제조된 더블-스트랜드 DNA상에 작용하고 스트랜드를 치환시키기 위해 신장된 스트랜드를 절단하는 어느 엔도뉴클레아제를 본 발명에서 사용할 수 있다. 즉, 엔도뉴클레아제는 더블-스트랜드 DNA의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 부위에 Nick을 제조하는 효소이다. 본 발명에서 사용될 수 있는 엔도뉴클레아제의 예는, 제한되는 것은 아니지만, 리보뉴클레아제들이다. 이들중에서, DNA 및 RNA로 구성된 더블-스트랜드 핵산의 RNA 부분에 작용하는 엔도리보뉴클레아제 H(RNase H)를 바람직하게 사용할 수 있다. 중온성 및 열-내성의 것들 포함하고, 상기 언급된 활성을 갖는 어느 리보뉴클레아제를 본 발명에서 바람직하게 사용할 수 있다. 예를 들면, 하기 실시예에 기재된 바와 같이 본 발명의 방법에서 E.Coli로부터의 RNase H를 약 50°C 내지 약 70°C에 반응을 위해 사용할 수 있다. 열-내성 리보뉴클레아제를 본 발명의 방법에서 바람직하게 사용할 수 있다. 바람직하게 사용될 수 있는 열-내성 리보뉴클레아제는 제한하는 것은 아니지만, 상업상 사용가능한 열-내성의 리보뉴클레아제, Hybridase™ Thermostable RNase H(Epicenter Technologies) 및 바실러스(*Bacillus*) 속의 고온성 세균, 썬무스(*thermus*) 속 세균, 피로코쿠스(*Pyrococcus*)속 세균, 썬모토가(*Thermotoga*) 속 세균, 아키오클로부스(*archaeoglobus*) 속 세균 등으로부터의 RNase H를 포함한다. 추가로 자연발생된 리보뉴클레아제 및 변이체가 바람직하게 사용될 수 있다. 본 명세서에서 언급하는 RNase H의 효소 유닛은 참조 실시예에 기재된 바와 같이 효소 유닛을 측정 방법에 따라 나타낸 값이다.

RNase H는 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 한 특성의 것으로 제한되지 않는다. 예를 들면, RNase H는 다양한 바이러스, 파지, 원핵생물 또는 진핵생물로부터 유래할 수 있다. 세포성 RNase H 또는 바이러스성 RNase H일 수 있다. 세포성 RNase H는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) RNase H에 의해 바이러스성 RNase H는 HIV-1에 의해 예시된다. I형, II형 또는 III형 RNase H는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들면, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase HI, 또는 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 세균 또는 아키오클로부스(*archaeoglobus*) 속 세균으로부터의 RNase H가 제한되지 않고 바람직하다.

본 발명의 방법에서 사용되는 RNase H와 같은 엔도뉴클레아제를 사용하는 절단 반응의 효율은 프라이머의 3'-말단 주위의 뉴클레오타이드 서열에 따라 달라질 수 있고 원하는 DNA의 종족 효율에 영향을 줄 수 있다. 그러므로, 사용되는 RNase H를 위해 최적의 프라이머를 작제하는 것이 적절하다.

본 명세서에서 사용되는 바, 용어 'Nick 삽입' 또는 'Nick(nicking)'은 더블-스트랜드 핵산의 두개의 스트랜드중 하나를 내부적으로 절단하는 것을 의미한다. 예를 들면, RNase H는 DNA 및 리보뉴클레오타이드-포함 DNA로 구성된 하이브리드 더블-스트랜드 핵산에 작용하여 두개의 스트랜드중에서 리보뉴클레오타이드 부분에서 리보뉴클레오타이드-포함 스트랜드를 선택적으로 절단한다.

### (3) 본 발명에서 사용되는 DNA 폴리머라제

본 발명에서 DNA상에 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 사용될 수 있다. 특히, 실질적으로 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성이 결핍된 DNA 폴리머라제가 바람직하게 사용될 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 바, '스트랜드 치환 활성'은 스트랜드를 치환시킬 수 있는, 즉, DNA 스트랜드를 치환하여 주형 스트랜드에 어닐링된 상보적인 스트랜드를 분리시키면서 주형으로서 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 DNA 복제를 수행할 수 있는 활성을 언급한다. 또한, 본 명세서에서 스트랜드 치환 결과 주형으로서 뉴클레오타이드 서열로부터 분리된 DNA 스트랜드를 '치환된 스트랜드'로서 언급한다.

본 발명에서 스트랜드 치환 활성을 갖는 어느 DNA 폴리머라제를 사용할 수 있다. 그의 예는 바실러스 탈도테넥스(*Bacillus subtilis*) (이하, B. ca로서 언급함) 및 바실러스 스테마로썬필루스(*Bacillus stearothermophilus*) (이하, B. st로서 언급함)와 같은 바실러스 속의 고온성 세균으로부터 유래된, 그들의 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성이 결핍된 DNA 폴리머라제, 및 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 I의 거대 단편(플레나우 단편)의 변이체를 포함한다. 중온성 및 열-내성 DNA 폴리머라제들 모두를 본 발명에서 바람직하게 사용할 수 있다.

B. ca는 약 70°C의 최적 성장 온도를 갖는 고온성 세균이다. 이 세균으로부터의 Bca DNA 폴리머라제가 DNA-의존 DNA 폴리머라제 활성, RNA-의존 DNA 폴리머라제 활성(역전사 활성), 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성 및 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는다고 공지되어 있다. 효소는 그의 기원으로부터의 정제된 효소 또는 유전 공학 기술에 의해 생산된 재배할 단백질일 수 있다. 효소를 유전 공학 기술 또는 다른 방법을 사용하여 치환, 결실, 첨가 또는 삽입에 의해 변형시킬 수 있다. 변형된 효소의 예는 그의 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성이 결핍된 Bca DNA 폴리머라제인 Bca BEST DNA 폴리머라제(Takara Shuzo)를 포함한다.

일부 DNA 폴리머라제는 특정 조건하에서 RNase H 활성과 같은 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 것으로 공지되어 있다. 그러한 DNA 폴리머라제를 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 일면으로, Mn<sup>2+</sup>의 존재하에서와 같이 RNase H의 활성을 발현시킬 수 있는 조건하에서 DNA 폴리머라제가 사용될 수 있다. 이러한 경우, 본 발명의 방법은 RNase H를 가하지 않고 수행될 수 있다. 본 발명자는 최초로 Mn<sup>2+</sup>를 포함하는 완충액에서 Bca DNA 폴리머라제가 RNase 활성을 보였고, 본 발명의 핵산을 증폭시키는 방법은 Bca DNA 폴리머라제의 다른 효소는 포함하지 않는 반응 혼합물중에서 수행될 수 있다는 것을 입증하였다. 상기 언급한 면은

Bca DNA 폴리머라제의 사용을 제한하지 않는다. 썬무스 썬모필러스(*Thermus stearothermophilus*)로부터의 Tth DNA 폴리머라제와 같이 RNase H 활성을 갖는 것으로 공지된 DNA 폴리머라제를 본 발명에서 사용할 수 있다.

#### (4) 본 발명에서 사용되는 반응 완충액의 조성

본 발명에서 완충 성분, 마그네슘염 및 dNTPs를 포함하는 반응 완충액을 사용할 수 있다. 자연적으로는 염의 형태 및 농도는 사용되는 금속 요구양 또는 효소 등에 따라 최적화된다. 바람직하게 사용할 수 있는 완충 성분의 예는, 제한하는 것은 아니지만, 트리신(Tricine), 트리스-히이드로클로라이드 및 인산염(예: 인산나트륨 및 인산칼륨)을 포함한다. 이들중에서, 완충 성분으로서 트리신 또는 인산염을 포함하는 완충액이 본 발명에서 바람직하다. 본 바람을 제한하는 것은 아니지만, 예를 들면 반응 온도가 고온인 경우 온도 변화에 의해 pH가 거의 변하지 않는 Bicine 완충액이 바람직하게 사용된다. 사용되는 RNase H의 형태에 따라 HEPES 완충액이 바람직할 수 있다. 따라서, 최적의 완충액은 반응 온도, 사용되는 엔도뉴클레아제 또는 DNA 폴리머라제 등에 따라 선택될 수 있다. 완충 성분의 최종 농도는 5-100mM, 바람직하게 20-50mM 범위이다. pH는 6.0-9.5, 바람직하게 7.0-9.2 범위이다. 예를 들면, pH 7.5-9.2에 22-46mM 트리스를 함유하는 완충액 또는 pH 7.0-8.0에 25-50mM 인산칼륨을 함유하는 완충액이 바람직하다. 바람직하게 사용될 수 있는 마그네슘염의 예는, 제한하는 것은 아니지만, 염화마그네슘, 마그네슘 아세테이트 또는 황산 마그네슘을 포함한다. 마그네슘염의 최종 농도는 1-20mM, 바람직하게 2-10mM 범위이다. 혼합물중 DNA 신장 반응용 기질로서 dNTPs(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP의 혼합물)의 최종 농도는 0.1-3.0mM, 바람직하게 0.2-1.2mM 범위이다. 50 $\mu$ l 반응 용량중에 사용되는 프라이머의 양은 1-1000pmol, 바람직하게 10-150pmol이다. 또한, 예를 들면, 반응 혼합물은 증폭 반응을 안정화시키기 위해 첨가제를 포함할 수 있다. 최종 농도 0.1% 이하의 송 혈청 알부민(BSA), 최종 농도 10% 이하의 디메틸설폭사이드, 최종 농도 4mM 이하의 푸트레신 디하이드로클로라이드, 또는 최종 농도 0.01% 이하의 프로필렌디아민을 첨가할 수 있다. 또한, NMP(1-메틸-2-피롤리딘), 글리세롤, 폴리(에틸렌 글리콜), 디메틸설폭사이드 및/또는 포름아미드를 포함할 수 있다. 그러한 유기 용매를 첨가하여 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 비특이적인 어닐링이 감소될 것으로 예상된다.

본 발명의 방법은 DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질 예로서 포스포노포름산(PFA)를 가하여 수행될 수 있다. 역전사 활성을 저해하는 물질을 가하는 경우 핵산외 비특이적 산물의 증폭이 감소된다.

또다른 일면으로 증폭 반응에 앞서 주형으로서 핵산을 본 발명에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 어닐링하는 것이 본 발명의 검출, 증폭 또는 생산 방법에서 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 비특이적 어닐링을 감소시키는 데 유효하다. 폴리머인(예: 스퍼인 또는 스퍼미딘) 또는 프로필렌디아민과 같이 어닐링을 증진시키는 물질을 포함하는 어닐링 용액을 사용하여 어닐링을 수행하는 것이 바람직할 수 있다. 바람직하게, 폴리머인을 포함하는 어닐링 용액 또한 염을 포함한다. 예를 들면, 제한하지 않고 어닐링 용액은 염화나트륨, 염화칼륨, 아세트산칼륨, 아세트산나트륨 등 및 폴리머인을 포함할 수 있다.

어닐링은 통상 프라이머 및 주형으로서 핵산을 포함하는 어닐링 용액을 더블-스트랜드 핵산이 변성되는 온도(예: 약 90°C 이상)에서 인큐베이션시킨 후 본 발명의 방법에서 사용되는 온도 이하로 용액을 냉각시켜 수행된다.

어닐링 후, DNA 폴리머라제, RNase H 및 dNTPs와 같은 다른 필수 성분을 혼합물에 추가로 가하여 본 발명의 핵산 증폭 반응을 개시한다.

50 $\mu$ l의 반응 용량중 엔도뉴클레아제의 예로서 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H 양은 바람직하게 3-200U, 더욱 바람직하게 15-60U 범위이다. 유사하게 50 $\mu$ l의 반응 용량중 엔도뉴클레아제의 예로서 피로코쿠스(*Picrococcus*)속 세균 또는 아키오글로부스(*Archaeoglobus*)속 세균으로부터의 RNase H 양은 바람직하게 3-200U, 더욱 바람직하게 4-40U 범위이다. 50 $\mu$ l 반응 용량중에 엔도뉴클레아제의 샘플로서 Bca BEST DNA 폴리머라제의 양은 바람직하게 0.5-100U, 더욱 바람직하게 1-22U 범위이다.

엔도뉴클레아제 및 DNA 폴리머라제를 본 발명의 방법에서 배합하여 사용하는 경우 예를 들면 제한하지 않고 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 피로코쿠스(*Picrococcus*)속 세균 또는 아키오글로부스(*Archaeoglobus*)속 세균 및 Bca BEST로부터의 RNase H의 배합물이 바람직하게 사용된다. 엔도뉴클레아제 및 DNA 폴리머라제의 바람직한 유닛수는 효소의 형태에 따라 달라질 수 있다고 예상된다. 그러한 경우, 사용되는 완충액의 조성 및 첨가되는 효소의 양은 인덱스로서 증폭 산물의 양 또는 검출 감수성의 증가를 사용하여 조정될 수 있다. 어느 경우에도, 사용되는 효소의 형태에 따라 반응 완충액의 조성 등을 최적화하는 것이 적절하다.

#### (5) 본 발명의 핵산을 증폭시키는 방법

본 발명의 방법은 상기 (1)에 기재된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 상기 (2)에 기재된 바와 같은 엔도뉴클레아제 및 상기 (3)에 기재된 바와 같은 DNA 폴리머라제와 배합하여 사용함으로써 수행될 수 있다. 또한 RNase H 활성을 갖는 DNA 폴리머라제는 상기 기재된 바와 같이 RNase H 활성을 발현시킬 수 있는 조건하에서 사용될 수 있다.

PCR 방법에 사용되는 dNTPs(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP)들을 방법중에서 신장 반응에서 기질로서 뉴클레오타이드 트리포스페이트로서 바람직하게 사용할 수 있다. dNTPs는 그것이 사용되는 DNA 폴리머라제에 대한 기질로서 작용하는 한 7-데자(deaza)-dGTP와 같은 dNTP 유사체를 포함할 수 있다. dNTP 또는 dNTP 유사체의 유도체를 사용할 수 있다. 아미노 그룹을 갖는 dUTP와 같은 작용 그룹을 갖는 유사체를 포함할 수 있다. 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 본 발명에서 사용할 수 있다. 상기 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 표준 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 배합하여 본 발명의 방법에서 사용할 수 있다.

사용되는 효소의 활성이 반응과정에서 감소하는 경우 본 발명의 방법에서 반응하는 동안 추가로 효소를 가할 수 있다. 본 발명을 제한하는 것은 아니지만, 예를 들면 RNase H이 사용되는 반응시 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터 RNase H를 추가로 가할 수 있다. 첨가된 효소는 반응 시작시 반응 혼합

를에 포함된 것과 동일할 수 있거나 동일한 합성을 보이는 상이한 효소일 수 있다. 따라서, 첨가되는 효소의 타입 또는 성질은 반응의 첨가가 검출 감수성의 증가 또는 증폭 산물 양의 증가와 같은 효과를 제공하는 한 특성의 것으로 제한하지 않는다.

본 발명의 방법에서 주형으로서 사용되는 핵산(DNA 또는 RNA)은 핵산을 포함할 수 있는 어느 샘플로부터 분리하거나 제조할 수 있다. 또한, 샘플은 본 발명에 따른 핵산 증폭 반응에서 직접 사용할 수 있다. 핵산을 포함할 수 있는 샘플의 예는, 제한하는 것은 아니지만, 전체 혈액, 혈청, 백혈구층(buffy coat), 소변, 대변, 뇌척수액, 정액, 침, 조직(예: 종양 조직 또는 림프절) 및 세포 배양액(예: 포유류 세포 배양액 또는 박테리움성 세포 배양액)과 같이 유기체로부터의 샘플, 비로이드(viroid), 바이러스, 박테리움, 진균, 효모, 식물 및 동물과 같이 핵산을 포함하는 샘플, 바이러스 또는 박테리움과 같은 미생물로 오염되거나 감염감염된 것으로 예측되는 샘플(예: 식물 또는 생물학적 제제), 및 토양 및 폐수와 같이 유기체를 포함할 수 있는 샘플을 포함한다. 상기 샘플은 공지된 방법에 따라 상기 기재된 바와 같은 샘플을 공정화하여 수득된 핵산을 함유하는 샘플(preparation)일 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 샘플의 예는 세포 파괴 산물 또는 상기 산물을 분별하여 수득한 샘플, 샘플중에 핵산, 또는 mRNAs가 풍부한 샘플과 같은 특이적인 핵산 분자들을 포함한다. 또한, 샘플중에 포함된 핵산을 공지된 방법에 따라 증폭시켜 수득한 DNA 또는 RNA와 같은 핵산을 바람직하게 사용할 수 있다.

핵산을 포함하는 샘플을 제한하지 않고, 예를 들면, 세제를 사용하는 세포 용해, 초음파 처리, 글래스 비드 또는 프렌치 프레스(French press)를 사용하는 진탕/교반을 사용하여 상기 언급된 물질로부터 제조할 수 있다. 일부 경우에는, 추가로 샘플을 공정하여 핵산을 정제하는 것이 유리하다(예: 엔도뉴클레아제가 존재하는 경우). 그러한 경우에, 핵산은 공지된 방법, 예를 들면, 페놀 추출, 크로마토그래피, 이온 교환, 겔 전기영동 또는 밀도-구배 농축에 의해 정제된다.

RNA로부터 유래된 서열을 갖는 핵산을 증폭시켜야 하는 경우, 주형으로서 RNA를 사용하는 역전사반응에 의해 합성된 cDNA를 주형으로서 사용하여 본 발명의 발명을 수행할 수 있다. 샘플중에 총 RNA, tRNA 및 rRNA와 같은 RNA 분자 및 특이 RNA 종을 포함하여, 역전사 반응용 프라이머를 제조할 수 있는 어느 RNA도 본 발명의 방법에 적용될 수 있다.

사용된 반응 조건하에서 주형으로서 RNA에 어닐링하는 어느 프라이머가 역전사 반응에서 사용될 수 있다. 프라이머는 주형으로서 특이 RNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머(특이적 프라이머), 폴리-고-dT 프라이머(데옥시티민) 프라이머 및 무작위 프라이머를 갖는 프라이머(무작위 프라이머) 일 수 있다. 특이적인 어닐링과 관련하여, 역전사용 프라이머의 길이는 바람직하게 6 뉴클레오타이드 이상, 더욱 바람직하게 9 뉴클레오타이드 이상이다. 폴리고뉴클레오타이드 합성과 관련하여, 길이는 바람직하게 100 뉴클레오타이드 이하, 더욱 바람직하게 30 뉴클레오타이드 이하이다. 키메라성 폴리고뉴클레오타이드 프라이머가 역전사용 프라이머로서 사용될 수 있다. 키메라성 폴리고뉴클레오타이드 프라이머는 또한 본 발명의 주형으로서 역전사 후 수득된 cDNA를 사용하여 핵산을 증폭시키는 방법에서 스트랜드 치환 반응을 프라이머로서 사용될 수 있다. 그러한 프라이머는 상기 (1)에 기재된 특성을 갖고 RNA로부터 역전사 반응에 사용될 수 있는 어느 것일 수 있다.

주형으로서 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하는 합성을 갖는 어느 효소가 역전사 반응에서 사용될 수 있다. 그의 예는 다양한 원으로부터 기원한 역전사효소, 예를 들면, 조류 골수아세포종바이러스-유래 역전사 효소(avian myeloblastosis virus-derived virus reverse transcriptase(AMV RTase)), 마우스 백혈병 바이러스-유래된 역전사 효소( murine leukemia virus-derived virus reverse transcriptase(MMLV RTase) 및 라우스-관련 바이러스 2 역전사 효소(Rous-associated virus 2 reverse transcriptase(RAV-2 RTase))를 포함한다. 또한, 역전사효소 합성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용할 수 있다. 싸모스속 박테리움으로부터의 DNA 폴리머라제(예: Tth DNA 폴리머라제) 및 바실러스(*Bacillus*)속의 고온성 박테리움으로부터의 DNA 폴리머라제와 같이 고온에서 역전사 합성을 갖는 어느 효소가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 본 발명을 제한하는 것은 아니지만, B. st로부터의 DNA 폴리머라제(Bst DNA 폴리머라제) 및 B. ca로부터의 DNA 폴리머라제(Bca DNA 폴리머라제)와 같은 바실러스(*Bacillus*)속의 고온성 박테리움으로부터의 DNA 폴리머라제가 바람직할 수 있지만, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 예를 들면, Bca DNA 폴리머라제는 역전사 반응을 위해 마그네슘 이온을 필요로 하지 않는다. 또한, 그것은 고온 조건하에서 주형으로서 RNA의 2차 구조 형성을 억제시키면서 cDNA를 합성할 수 있다. 역전사 효소합성을 갖는 천연의 것 및 상기 효소의 변이체는 그들이 상기 합성을 갖는 한 사용될 수 있다.

또다른 일면에서 앞서 증폭시키고자 하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA를 복제한 후 본 발명의 방법에서 복제된 산물을 주형으로서의 핵산으로서 사용할 수 있다. 복제 방법의 예로서 제한하는 것은 아니지만, 증폭시키고자 하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 단편이 삽입된 벡터를 사용하여 적절한 숙주 세포를 형질전환시키고, 생성된 형질전환주를 배양하고, 증폭시키고자 하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 단편이 삽입된 벡터를 그로부터 추출하고 사용하는 것을 포함하는 방법을 포함한다. 벡터는 숙주내에서 안정하게 복제되는 한 어느 것을 사용할 수 있다. 예로서, pUC 시리즈, pBluescript 시리즈, pGEM 시리즈, 코스미드형 벡터 및 피지형 벡터가 바람직하게 사용된다. 숙주는 사용되는 벡터를 유지할 수 있는 한 어느 것을 사용할 수 있다. 예를 들면, 용이하게 배양되는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)를 들 수 있다.

복제 방법의 다른 일면으로 증폭시키고자 하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 RNA를 RNA 폴리머라제 및 주형으로서 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 단편을 사용하여 전사시킨 후 직접 또는 역전사 반응에 의해 cDNA로 전환시킨 후 RNA를 본 발명의 방법을 위한 주형으로서 사용할 수 있다. 증폭시키고자 하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 단편은 RNA 폴리머라제에 대한 프로모터 서열을 갖는 한 특성의 것으로 제한하지 않는다. RNA 폴리머라제에 대한 프로모터 서열을 갖는 벡터내로 삽입되고, 그의 말단에 RNA 폴리머라제에 대한 프로모터 서열을 갖는 아퍼터 또는 카세트로 결합되거나 RNA 폴리머라제에 대한 프로모터 서열을 갖는 프라이머 및 적절한 주형을 사용하여 효소적으로 합성될 수 있다. 따라서 증폭시키고자 하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 단편은 상기 기재된 바와 같이 위치하는 RNA 폴리머라제에 대한 프로모터 서열을 사용하여 RNA 형태로 복제되거나 증폭될 수 있다. RNA 폴리머라제에 대한 프로모터 서열을 갖는 한 모든 벡터가 사용될 수 있다. 예를 들면, pUC 시리즈, pBluescript 시리즈, pGEM 시리즈, 코스미드형

벡터 및 파지형 벡터가 바람직하게 사용된다. 환상 형태로 또는 선형화된 후 바람직하게 사용될 수 있다. RNA 폴리머라제는: 복제 또는 증폭을 위해 사용될 수 있다. 예로서, SP6 RNA 폴리머라제, T7 RNA 폴리머라제, T3 RNA 폴리머라제 등을 바람직하게 사용할 수 있다.

분리된 게놈 DNA 또는 PCR 단편과 같은 더블-스트랜드 DNA 및 총 RNA 또는 mRNA로부터의 역전사 반응에 의해 제조된 cDNA와 같은 싱글-스트랜드 DNA 둘 모두를 본 발명에서 주형 DNA로서 바람직하게 사용할 수 있다. 더블-스트랜드 DNA는 그것을 싱글-스트랜드 DNA로 변형시킨 후 사용하는 것이 바람직하다.

PCR 증폭 산물과 같은 선형의 더블-스트랜드 DNA를 주형으로서 사용하는 경우, 본 발명의 증폭 방법에서 변형 단계는 삭제될 수 있다. 본 발명의 프라이머에 대한 어닐링 부위에 DNA의 말단으로부터 내부로 약 50개의 염기를 위치시켜 삭제를 수행할 수 있다. 본 발명의 DNA 합성 방법에서 하나의 DNA 폴리머라제를 사용하여 RNA로부터의 서열을 갖는 핵산을 증폭시키는 경우, 주형으로서 RNA를 사용하여 역전사 반응에 의해 수득한 RNA-cDNA 더블 스트랜드 핵산을 RNase H를 포함하는 본 발명의 증폭 반응 혼합물에 가하여 RNA 스트랜드를 분해하고 싱글-스트랜드 cDNA로 핵산을 전환시켜 증폭 반응을 개시할 수 있다. 또한, 주형으로서 RNA를 사용하는 역전사반응 및 역전사 반응에 의해 제조된 cDNA를 주형으로서 사용하는 DNA 증폭 반응을 수행할 수 있다. 그러한 DNA 폴리머라제는 역전사 효소 활성 및 스트랜드 치환 활성을 갖는다.

단편중에 전체 표적 서열 또는 적어도 충분한 부분의 표적 서열이 존재하기 때문에 적절한 길이의 주형은 프라이머 서열이 충분히 결합할 수 있게 제공하는 것이다.

제한하지 않고, 주형으로서 DNA가 더블-스트랜드 DNA인 경우, DNA를 싱글-스트랜드 DNA로 변형시켜 본 발명의 방법에서 프라이머가 주형으로서 DNA 스트랜드에 결합할 수 있도록 한다. 더블-스트랜드 DNA가 변형되는 온도(예: 약 95°C)에서 그것을 인큐베이션시키는 것이 변형을 위해 바람직할 수 있다. 다른 방법은 증가된 pH를 사용하는 것을 포함한다. 이러한 경우, pH를 감소시켜 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 표적에 결합할 수 있도록 하여야 한다. 더블-스트랜드 DNA를 싱글-스트랜드 DNA로 변형시키거나, RNA를 주형으로서 사용하는 경우, 역전사 반응에 의해 cDNA(싱글-스트랜드 DNA)를 제조한 후, 순차적으로 등은 조건 하에서 핵산을 증폭시킨다.

'순차적으로'는 반응 온도 또는 반응 혼합물의 조성을 변화시키지 않고 반응을 수행하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 바, '등온'은 실질적으로 그 온도하에서 각 단계에서 효소 및 핵산 스트랜드가 작용하는 상온(constant temperature) 조건을 의미한다.

본 발명의 핵산 증폭 반응은 클레나우 단편과 같은 종온성 DNA 폴리머라제를 사용하여 표준 온도(예: 37°C)에서 수행할 수 있다. 또한, 그것은 열-내성 효소(엔도뉴클레아제 또는 DNA 폴리머라제)를 사용하여 고온 온도(예: 50°C 이상, 또는 60°C 이상)에서 수행할 수 있다. 이러한 경우, 프라이머의 비특이적 어닐링은 억제되어 DNA 증폭의 특이성은 증가한다. 또한, 주형으로서 DNA의 2차 구조 형성의 문제점을 해결함으로써, DNA 폴리머라제의 신장 능력을 증가시킨다. 본 발명에서 역전사 반응 및 핵산 증폭을 순차적으로 수행할 수 있다. 이러한 경우, 역전사 효소를 상기 언급된 반응과 사용하거나 역전사 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 RNA로부터 유래된 서열을 갖는 DNA를 증폭시킬 수 있다.

본 발명의 상기 언급된 각각의 일면에서, 본 발명을 제한하는 것은 아니지만, 주형으로서 싱글-스트랜드 DNA에 상보적인 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 DNA에 어닐링시킨다. 이어서, DNA 폴리머라제의 작용에 의해 프라이머의 3'-말단으로부터 주형으로서 DNA의 잔존 서열을 따라 주형으로서 DNA에 상보적인 DNA(프라이머-신장된 스트랜드)를 신장시켜 더블-스트랜드 DNA를 합성한다. 엔도뉴클레아제는 더블-스트랜드 DNA에 작용하고 다시 프라이머-신장된 스트랜드의 프라이머 부위로부터의 DNA 재신장을 시작한다. 본 발명의 일면으로, 엔도뉴클레아제는 더블-스트랜드 DNA에 Nick 삽입시키는 Nick 효소로서 작용하거나 본 발명으로 이용으로서 제한하는 것은 아니지만, 엔도뉴클레아제는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 주형으로서 DNA로 구성된 더블-스트랜드 DNA의 구조를 변경시킬 수 있다. 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제는 Nick의 3'-말단의 하류에서 DNA를 분리시키면서 더블-스트랜드 DNA중에 삽입된 Nick의 3'-말단으로부터 DNA 스트랜드를 재-신장시켜 신규의 프라이머-신장된 스트랜드를 제조한다. 따라서, 신규의 프라이머-신장된 스트랜드가 앞서 합성된 프라이머-신장된 스트랜드를 대신한다.

두개의 프라이머, 즉, 주형으로서 핵산에 상보적인 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 치환된 스트랜드에 상보적인 또다른 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 본 발명의 핵산 증폭시키는 방법은 수행할 수 있다. 이러한 경우, 하나의 프라이머는 주형으로서 DNA 스트랜드에 결합하여 스트랜드 치환 반응을 개시하는 반면, 또다른 프라이머는 스트랜드 치환 반응 결과 분리된 치환된 스트랜드에 결합하여 또다른 스트랜드 치환 반응을 개시한다. 이 면이 사용되는 경우, 하나의 프라이머를 갖는 반응산물이 또다른 프라이머에 대한 주형으로서 작용할 수 있다는 것은 자명하다. 따라서, 비-선형 방법에서 주형의 양이 증가함에 따라 증폭산물의 양이 증가한다.

주형으로서 더블-스트랜드 DNA를 사용하여 본 발명의 핵산의 증폭 방법을 수행하는 경우, 두개의 스트랜드는 각각 두개의 스트랜드에 어닐링하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 증폭 반응에서 주형으로서 작용할 수 있다. 반응을 더블-스트랜드 DNA의 변형 후에 개시하는 경우, 더블-스트랜드 DNA의 변형 전후로 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 4개의 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트(dNTPs), DNA 폴리머라제 및 엔도뉴클레아제를 반응 혼합물에 첨가한다. 더블-스트랜드 DNA를 변형시키기 위해 열처리를 사용하고 열-내성 효소를 사용하지 않는 경우, 변형 후 효소를 첨가하는 것이 바람직하다.

주형으로서 더블-스트랜드 DNA 및 두개의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 본 발명의 핵산 증폭 방법에서 반응 조건 등에 따라 신장 반응동안 주형-신장된 스트랜드 중간체중 프라이머로부터 주형의 변환(switching)이 발생하여 서로 어닐링되는 합성 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 생성할 수 있다. 더블-스트랜드 핵산은 양쪽 끝에 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 갖는다. 이어서 스트랜드 치환을 포함하는 상보적 스트랜드를 신장하는 반응 양쪽 끝으로부터 다시 시작할 수 있다. 반응 결과, 한쪽 끝에서 프라이머 서열을 갖는 증폭 산물을 생산된다. 추가로, 반응시 주형의 변환이 발생하는 경우 상기 기술된 것과 유사한 더블-스트랜드 핵산을 다시 생산된다.

본 발명은 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형 스위치 반응시키는 것을 포함하는



핵산을 증폭시키는 방법을 제공한다. 주형으로서 더블-스트랜드 핵산, 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 두개의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제의 존재하의 주형 스위치 반응에서 주형에 상보적인 두개의 프라이머-신장된 스트랜드가 합성된다. 프라이머-신장된 스트랜드 합성시 주형으로부터 다른 프라이머-신장된 스트랜드로의 각 프라이머-신장된 스트랜드의 주형 변환이 일어난다.

본 명세서에서 사용되는 바, 주형 스위치 반응은 상보적 스트랜드가 스트랜드 치환 반응에 의해 더블-스트랜드 핵산의 양측으로부터 합성되는 경우, DNA 폴리머라제가 주형을 변환하고 이후 또다른 DNA 폴리머라제에 의해 새로 합성된 다른 상보적 스트랜드를 주형으로서 사용하여 상보적 스트랜드를 합성하는 것 반응을 언급한다. 즉 주형 스위치 반응 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 신장된 스트랜드를 생성하는 반응을 언급하고, 여기에서 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하는 DNA 폴리머라제는 신장된 스트랜드의 합성시 원 주형으로부터 다른 프라이머-신장된 스트랜드로 주형을 활발하게 변환한다. 주형 스위치 반응시키는 DNA 폴리머라제의 능력은 예로서 하기 실시예 32에 기술되는 방법에 따라 측정할 수 있지만, 이는 본 발명의 제한하는 것은 아니다.

스트랜드 치환 반응시 주형 스위치 반응시킬 수 있는 DNA 폴리머라제가 본 발명에서 바람직하게 사용될 수 있다. 예로서, 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성이 결핍된 Bca DNA 폴리머라제의 다양한 효소가 특히 바람직하게 사용된다. 그러한 효소는 상업적으로 BcaBEST DNA 폴리머라제(Takara Shuzo)로서 이용할 수 있다. 일본 특허 2978001에 기술된 방법에 따른 효소에 대한 유전자를 포함하는 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) HB101/pU1205 (FERM BP-3720)으로부터 제조될 수 있다. 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) HB101/pU1205 (FERM BP-3720)는 1991년 5월 10일(기탁일)에 International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central(6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8565, Japan)에 기탁되었다.

본 발명을 제한하는 것은 아니지만, 본 발명의 핵산을 증폭시키는 방법의 반응 모드는 예로서 하기와 같이 고려된다.

본 발명의 핵산을 증폭시키는 방법에서, 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 RNase H 존재하에 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 두개의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성한다. 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산 및 주형 스위치 반응 결과 두개의 프라이머가 어닐링하는, 서로 어닐링하는 주형으로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득할 수 있다. 후자의 더블-스트랜드 핵산을 주형으로서 재사용한다. 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산은 리보뉴클레오타이드를 포함하는 부위에서 RNase H로 분해된다. 주형에 상보적인 핵산은 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환시킨다. 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산 및 주형 스위치 반응 결과 두개의 프라이머가 어닐링하는, 서로 어닐링하는 주형으로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득할 수 있다.

주형 스위치 반응이 일어나지 않는 경우, 각 주형 및 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 두가지 형태의 더블-스트랜드 핵산을 수득할 수 있다.

두가지 형태의 더블-스트랜드 핵산은 리보뉴클레오타이드를 포함하는 부위에서 RNase H로 분해된다. 주형에 상보적인 핵산은 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환시킨다. 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산 및 주형 스위치 반응 결과 두개의 프라이머가 어닐링하는, 서로 어닐링하는 주형으로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득할 수 있다.

본 발명의 핵산을 증폭시키는 방법에서, 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 RNase H의 존재하에 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 두개의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로 처리하고, 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성한다. 주형 스위치 반응이 일어나지 않는 경우, 각 주형 및 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 두가지 형태의 더블-스트랜드 핵산을 수득할 수 있다.

본 발명의 증폭 방법에서, 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머-신장된 스트랜드는 리보뉴클레오타이드를 포함하는 부위에서 분해되어 분해로부터 생성된 5' 단편 (프라이머 부위)는 리보뉴클레오타이드를 포함하지 않을 수 있다. 그렇게 생성된 프라이머 부위로부터 신장된 프라이머-신장된 스트랜드는 연도뉴클레아제에 의해 더이상 분해되지 않는다. 결과 끝에 프라이머 서열을 갖는 증폭 산물이 생성된다.

상기 기재된 바와 같이, 양쪽 끝에 프라이머 서열을 갖지 않는 증폭 산물 및 프라이머 서열(들)을 갖는 산물이 본 발명의 핵산 증폭 방법에서 생산될 수 있다. 이들 산물이 본 명세서에서 증폭 산물로 포함된다.

본 발명의 핵산 증폭 방법의 예를 도 33 내지 36에 도시한다. 다시 말해 도 33 내지 36은 본 발명의 핵산 증폭 방법에서 예시적인 핵산 증폭을 설명한다.

도 33 내지 36은 DNA 주형으로서 더블-스트랜드 핵산인 DNA, 주형으로서 DNA의 뉴클레오타이드 서열 정보에 기초하여 합성된 한쌍의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 (도에서, 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 3개의 리보뉴클레오타이드를 3'-말단에 갖고; 도에서 오픈 서클은 리보뉴클레오타이드를 나타낸다), 스트랜드 치환 활성을 갖는 스트랜드 치환형 DNA 시판아제 (DNA 폴리머라제), DNA-RNA 하이브리드 위치에서 분해하는 리보뉴클레아제인 RNase H, 신장된 스트랜드로 삽입시키고자 하는 기질인 dNTPs의 존재하에 예시적인 핵산 증폭 방법을 설명한다.

도 33에 나타낸 바와 같이, 주형으로서 DNA의 뉴클레오타이드 서열 정보에 기초하여 합성된 한쌍의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 주형으로서 DNA의 특정 부위에 어닐링한다. DNA 스트랜드는 단계 1에

나타낸 스트랜드 치환 반응의 결과로서 각 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 3'-말단으로부터 신장된다.

이후, 도 34에 나타낸 바, 단계 2에 나타낸 바와 같이 주형 스위치 반응 결과 상류 및 하류로부터 신장된 일부의 프라이머-신장된 스트랜드는 원 주형으로부터 유리된다. 프라이머-신장된 스트랜드는 그 3' 부위에서 서로 어닐링한다. 상보적 스트랜드는 서로 어닐링하는 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 DNA를 형성하면서 어닐링된 신장된 스트랜드로부터 신장된다. 또한, 상기 언급된 한쌍의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 어닐링하는 서로 어닐링하는 치환된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 DNA가 생성된다. 이를 도 34에서 출발 물질로서 사용한다.

도 35의 단계 3에 나타낸 바, 서로 어닐링하는 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 도 34의 더블-스트랜드 DNA의 키메라성 올리고뉴클레오타이드로부터 유도된 RNA를 포함하는 단 하나의 스트랜드만이 더블-스트랜드 DNA의 DNA/RNA 하이브리드 사이트에서 RNase H의 작용에 의해 분해되고, 더블-스트랜드 DNA에 Nick을 삽입한다.

이어서, 스트랜드 치환 반응이 더블-스트랜드 DNA의 Nick으로부터 일어나고 DNA는 도 35의 단계 4와 같이 신장된다. 이어서 도 34의 단계 2와 같은 주형 스위치 반응은 얼마간 또는 그 비율로 일어나고, 종족 산물, 즉 서로 어닐링하는 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드를 생성한다.

또한, 상기 언급한 쌍의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 어닐링하는 서로 어닐링하는 치환된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 DNA가 생성된다.

이후, 도 36에 나타낸 바와 같이, DNA 스트랜드는 스트랜드 치환 반응의 결과로서 각 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 3'-말단으로부터 도 35의 쌍의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 어닐링하는 서로 어닐링하는 치환된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 DNA로 신장된다. 단계 2 및 단계 5의 것과 유사한 주형 스위치 반응이 얼마간 일어나고 이로써 서로 어닐링하는 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드가 생성된다. 이 더블-스트랜드 DNA를 도 35의 단계 3으로 다시 되돌린다. 반응을 단계 3에서 다시 시작한다. 쌍의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 어닐링하는 서로 어닐링하는 치환된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 DNA를 생성하고 도 36에서 출발물질로서 사용한다. 결과 이를 더블-스트랜드 핵산이 반복적으로 생성되는 연쇄 반응으로 한쌍의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 의해 결합된 영역을 증폭시키고 생성한다.

키메라성 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 본 발명의 핵산 증폭 방법에서 증폭시키고자 하는 영역이 서로 연결된 폴리머가 생성될 수 있다. 폴리머는 증폭시키고자 하는 다수의 영역이 동일한 방향으로 반복된 구조를 갖는다. 폴리머는 종족 산물의 전기영동 분석시 래더 밴드(laddered band)로서 관찰된다. 폴리머 생성은 증폭시키고자 하는 영역, 영역의 크기, 측면 영역, 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 뉴클레오타이드 서열, 반응 조건 등에 의해 영향을 받는 것으로 판단된다.

상기 기재된 바와 같이 폴리머는 증폭시키고자 하는 다수의 영역을 포함한다. 예로서, 폴리머는 적절한 프로브를 사용하여 하이브리화시키는 경우 다수의 프로브와 하이브리드하고 강한 시그널을 발생시킬 때 문에 증폭시키고자 하는 영역을 포함하는 핵산을 검출하고자 하는 경우 유용하다. 증폭시키고자 하는 영역 또는 그의 일부는 제한 효소 등에 의한 분해에 의해 모노머로서 또는 그의 배합물로서 폴리머로부터 수득될 수 있다.

본 발명에서 사용되는 DNA 폴리머라제는 앞서 신장된 DNA 스트랜드를 치환하면서 Nick된 부위로부터 하류 방향으로 신장되는 스트랜드를 합성하여야 한다. DNA 폴리머라제는 치환된 스트랜드를 분해할 수 있는 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성을 나타내지 않는 것이 중요하다. 예를 들면, *E. coli*로부터의 DNA 폴리머라제 I의 엑소뉴클레아제-결합 변이체인 플레나우 단편, Bst DNA 폴리머라제로부터 유래된 유사한 단편(New England Biolabs), 및 B. ca로부터의 Bca BEST DNA 폴리머라제(Takara Shuzo)를 그러한 DNA 폴리머라제로서 사용한다. 시퀀나아제(Sequenase) 1.0 및 시퀀나아제 2.0(United States Biochemical), 및 (Gene, 97:13-19(1991))에 기재된 T5 DNA 폴리머라제 및  $\phi$ 29 DNA 폴리머라제를 또한 사용할 수 있다. 적절한 억제제를 첨가하여 활성을 억제시키는 경우, 일반적으로 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라제를 DNA 합성 방법에서 사용할 수 있다.

본 발명의 핵산 증폭 방법은 다양한 온도 또는 등온에서 수행될 수 있다. 다양한 온도는 각 단계에서의 변화가 반응을 방해하지 않도록 각 단계를 위해 반응 온도를 변화시키는 것을 의미한다. 특히, 다양한 온도는 예를 들면, 프라이머의 어닐링, 상보적 스트랜드의 합성 반응, 상보적 스트랜드의 Nick(nicking) 및 치환 반응의 각각에 적절한 온도의 변화를 언급한다.

한편, 등온은 각 단계에 대한 반응 온도는 불변하고 각 단계를 실질적으로 상온(constant temperature)에서 수행하는 것을 의미한다. 둘 모두의 경우에서 반응 조건을 최적화하기 위해 온도를 선택하는 것이 적절하다.

본 발명의 핵산 증폭 방법의 하나의 특성은 상기 방법은 핵산 합성동안 온도를 상하로 조정할 필요가 없다는 것이다. 따라서, 본 발명은 등온으로 뉴클레오타이드 서열을 합성하는 방법을 제공하는 것이다. 다수의 통상적인 핵산 증폭 방법은 합성된 스트랜드로부터 표적을 해리시키기 위하여 온도를 상하로 조절하는 것을 필요로 한다. 이들 방법은 이 목적을 위해 열 사이클러(thermal cycler)와 같은 특별한 반응 장치를 필요로 한다. 그러나, 본 발명의 방법은 단지 온도를 일정하게 유지시킬 수 있는 장치만을 사용하여 수행된다. 상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 방법은 단일 온도에서 수행될 수 있다. 바람직하게, 프라이머의 비-특이적인 어닐링을 감소시키고 프라이머가 특이적으로 주형으로서 뉴클레오타이드 서열에 어닐링할 수 있도록 반응 온도 및 엄격한(stringency) 수준을 선택하여 수행한다. 본 발명을 제한하는 것은 아니지만, 본 발명의 방법은 상기 기재된 열-내성 효소를 사용하여 고온 조건하에서 수행될 수 있다. 또한, 사용되는 효소의 활성을 충분히 유지하기 위한 적절한 온도에서 본 발명의 방법을 수행하여 반응 효율을 고수준으로 유지시키는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 반응 온도는 사용되는 효소에 따라 달라질 수 있지만, 바람직하게, 20°C 내지 약 80°C, 더욱 바람직하게 약 30°C 내지 약 75°C, 가장 바람직하게 약 50°C 내지 약 70°C이다. 특히 고온 조건하에서 반응을 수행하는 경우, 표준 온도에서의 반응을 위한 것보다 더욱 긴

프라이머를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 반응 온도에 적절한 프라이머의 서열 및 길이는 예를 들면, 그의  $T_m$  값을 참고로하여 결정될 수 있다. 또한, 0.100<sup>TM</sup> 프라이머 어날리시스 소프트웨어(Takara Shuzo)와 같이 프라이머를 디자인하기 위한 상업적으로 사용가능한 소프트웨어를 사용할 수 있다. 예를 들면, 55°C 내지 60°C 또는 65°C의 반응 온도를 사용하는 경우, 본 발명의 방법에서 사용되는 프라이머의 길이는 예를 들면, 제한하지 않고, 12-1000 뉴클레오타이드, 바람직하게 14-50 뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게 15-40 뉴클레오타이드이다. 반응 온도를 승온시킴으로써 얻은 효과의 예는 주형으로서 DNA의 2차 구조 형성의 문제를 해결한 것이다. 높은 GC 함량을 갖는 핵산을 주형으로서 사용하여도, 반응 온도를 승온시킴으로써 원하는 핵산을 증폭시킬 수 있다. 또한, 그것은 유사하게 장쇄의 영역을 증폭시키는데 효과적이다. 그러한 효과는 약 60bp 내지 약 20 kbp 사이, 특히 약 110bp 내지 약 4.3 kbp 사이, 더욱 바람직하게 약 130bp 내지 약 1500 bp 사이 범위에서 관찰된다.

증폭 효능은 주형으로서 핵산의 GC 함량에 따라 반응 온도를 조절하여 증가시킬 수 있다. 예를 들면, 낮은 GC 함량을 갖는 핵산을 주형으로서 사용하는 경우 온도는 증폭시키고자 하는 핵의 길이 및 프라이머의  $T_m$  값에 따라 달라질 수 있지만 본 발명의 증폭 반응은 50 내지 55°C에서 수행될 수 있다.

RNA로부터 cDNA를 제조하는 단계(역전사 반응)를 통상적으로 수행하는 것을 포함하여, 본 발명의 방법에서 역전사 효소 활성을 갖는 DNA 폴리머라제(예: Bca BEST DNA 폴리머라제)를 사용하여 RNA로부터 핵산을 증폭시킨다. 또한, RNA로부터 핵산을 증폭시키는 단계를 독립적으로 수행하여 수득한 산물, 즉, cDNA를 본 발명의 방법에서 주형으로서 DNA로서 사용할 수 있다.

각 경우에서, 적절한 방법, 예를 들면, 효소를 불활성시키거나 반응 온도를 낮추어 그것이 증폭될 때까지, 또는 반응에서 기질중 하나가 부족할 때까지 본 발명의 방법에서 반응을 반복한다.

본 발명의 핵산 증폭 방법은 핵산의 검출, 표지 및 서열화를 포함하는 핵산 증폭을 사용하는 다양한 실험 방법을 위해 사용될 수 있다.

또한, 본 발명의 핵산 증폭 방법은 DNA 칩과 같은 고체 기질상의 핵산을 증폭시키는 방법인 인시츄(in situ)에서의 핵산 증폭 방법, 또는 다수의 영역을 동시에 증폭시키는 멀티플렉스 핵산 증폭 방법을 위해 사용될 수 있다.

본 발명의 핵산 증폭 방법의 하나의 특징은 싱글-스트랜드 DNA를 제조하는 그의 능력이다. 이 목적을 위해 하나 또는 두개의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용할 수 있다. 예를 들면, 두개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 경우, 본 발명의 방법은, 또다른 것에 대하여 상대적으로 과량의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 수행되는 증폭 방법인 비대칭 PCR 방법을 위해 사용되는 것과 같은 프라이머 비를 적용시켜 수행할 수 있다. 결과적으로, 하나의 스트랜드로부터 치환된 산물의 양은 또 다른 것로부터의 것에 대하여 상대적으로 과량이다. 제한하는 것은 아니지만 프라이머 비는 바람직하게 1:10 내지 1:500 범위, 더욱 바람직하게 1:10 내지 1:100의 범위이다. 결과 하나의 스트랜드로부터의 치환 산물의 양은 또다른 것로부터의 것과 비교하여 과량이다.

본 발명의 핵산 증폭 방법에 따라, 그의 상보적인 스트랜드가 실질적으로 결핍된 싱글-스트랜드 DNA를 제조할 수 있다. 예를 들면, DNA 칩과 같이 고정하고자 하는 핵산을 갖는 물질을 제조하기 위한 싱글-스트랜드 DNA, 핵산을 검출하기 위한 싱글-스트랜드 DNA 프로브, 또는 장쇄 PCR 방법용 메가-프라이머(mega-primer)를 단시간에 용이하게 제조할 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여 단지 센스 서열(sense sequence) 또는 안티센스 서열(anti sense sequence)을 선택적으로 증폭시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 센스 서열 또는 안티센스 서열을 갖는 핵산을 제조하는 방법으로서 유용하다.

관심의 대상이 되는 핵산 영역은 Bicine, Tricine, HEPES, 포스페이트 또는 트리스의 완충액중 본 발명의 방법을 수행하여 주형으로서 미량의 핵산으로부터도 증폭될 수 있다.

또한, 본 발명의 핵산 증폭 방법은 시간동안 온도를 조절할 수 있는 반응 장치의 사용을 필요로 하지 않는다. 그러므로, 증폭 반응은 대량의 반응 혼합물중에서 수행될 수 있다. 따라서, 핵산(예: 의료용)을 대량으로 산업적으로 생산할 수 있다.

본 발명의 핵산 증폭 방법에서 사용된 프라이머의 사용 효율은 PCR 방법과 같은 통상의 방법에서 것보다 5- 내지 10배 높은 약 100%이다.

본 발명의 핵산 증폭 방법은 주형 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 고도로 동일한 증폭 산물을 생산할 수 있다. 본 발명의 방법에서 DNA 합성의 오차 빈도수를 생성된 증폭 산물의 뉴클레오타이드 서열을 분석하여 확인했을 때, 본 발명의 방법에 의해 수득된 증폭 산물에서 발견된 오차 빈도수는 고도로 동일하게 증폭시킬 수 있는 것으로 공지된 LA-PCR에 의한 것과 동일하였다. 다시 말해, 본 발명의 방법은 LA-PCR의 것과 동일한 고도의 동일성을 갖는다.

#### (6) 본 발명의 핵산 검출 방법 및 상기 방법을 위한 키트

본 발명의 핵산 증폭 방법을 사용하여 샘플중 핵산을 검출할 수 있다. 검출은 하기 방법을 포함한다:

- 상기 기재된 비와 같은 본 발명의 핵산 증폭 방법에 의해 표적 핵산을 증폭시키고;
- 상기 단계에서 증폭된 핵산을 검출한다.

상기 단계 (a)에서, 주형으로서 RNA를 사용하는 경우 1단계에서 역전사 반응 및 핵산 증폭 반응이 수행될 수 있다. 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니지만, 예로서, AMV RTase, MMLV RTase 또는 RAY-2 RTase 및 BcDNA 폴리머라제의 배합물을 리버스 트랜스크립타제 및 스트랜드 치환형 DNA 폴리머라제의 배합물로서 바람직하게 사용할 수 있다.

본 발명을 사용하여 샘플중에 특이적 유전자를 검출하거나 육량화할 수 있다. 즉, 특이적 유전자는 검출하거나 육량화된 형태이다. 즉, DNA 또는 RNA와 같은 핵산을 포함할 것으로 예측되는 모든 샘플로부터 특이적 유전자를 검출하거나 육량할 수 있다. 특이적 유전자가 검출하거나 육량될 수 있는 샘플의 예는,

제한하는 것은 아니지만, 전체 혈액, 혈청, 백혈구층, 소변, 대변, 뇌척수액, 정액, 침, 조직(예: 종양 조직 또는 림프절) 및 세포 배양액(예: 포유류 세포 배양액 또는 박테리움성 세포 배양액)과 같은 유기체로부터의 샘플, 비로이드, 바이러스, 박테리움, 균류, 효모, 식물 및 동물과 같은 핵산을 포함하는 샘플, 바이러스 또는 박테리움과 같은 미생물로 오염되거나 감염된 샘플(예: 식품 또는 생물학적 제제), 및 토양 및 폐수와 같은 유기체를 포함할 수 있는 샘플을 포함한다. 예를 들면, 샘플 중의 비로이드, 바이러스, 박테리움, 균류 또는 다른 미생물은 표적으로서 비로이드, 바이러스, 박테리움, 진균 또는 다른 미생물로부터 유래된 특이적 유전자의 존재 또는 함량에 기초하여 검출 또는 측정될 수 있다. 특히 병원성 미생물을 검출하는 방법이 위생 및 환경 분야에서 유용하다. 또한, 본 발명의 방법을 사용하여 유기체의 유전자형을 식별하거나 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있다. 특히, 질병-관련 유전자, 예로서 세포의 암 유발과 관련된 유전자의 발현 상태를 검출하거나 확인하는 것이 의학 분야에서 유용하다. RNA 및 DNA 둘 모두를 검출 방법에서 주형으로서의 핵산으로 바람직하게 사용할 수 있다.

본 발명의 표적 핵산 검출 방법은 서열 표적 핵산의 뉴클레오타이드의 사이를 식별하기 위하여 사용될 수 있다. 이 측면에서, 사용하고자 하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 3'-말단 부위가 식별하고자 하는 표적 뉴클레오타이드 서열의 특정 염기에 가깝게 위치하도록 작제한다. 예를 들면, 수소 결합이 프라이머의 3'-말단 부위 및 염기 사이에 형성되도록 작제한다. 프라이머의 3'-말단 부위의 뉴클레오타이드 서열 및 주형의 뉴클레오타이드 서열 주형 사이에 불일치가 존재하는 경우, 표적 핵산으로부터 증폭은 발생하지 않고, 상기 언급한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 증폭 산물은 생성되지 않는다. 점돌연변이(point mutation) 또는 단일염기변이 (SNP)와 같은 유전자의 특정 염기와 관련된 정보를 상기 방법을 사용하여 획득할 수 있다.

본 발명의 표적 핵산 검출 방법은 핵산을 포함하는 샘플로부터 직접 표적 핵산을 증폭시켜 수행할 수 있다. 이러한 경우, 증폭시키고자 하는 표적 핵산의 새 길이는 특정의 것으로 제한하지 않는다. 예를 들면, 2000이하, 바람직하게 150 bp이하의 영역이 표적 핵산의 감수성 검출에 효과적이다. 샘플 중 표적 핵산은 본 발명의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 작제하여 고감수성으로 검출하여 상기 기재된 바와 같이 증폭시키고자 하는 새를 얻을 수 있다.

또한, 표적 핵산은 완충 성분으로서 Bicine, Tricine, HEPES, 포스페이트 또는 트리스를 포함하는 반응 완충액 및 상기 (4)에 예시된 스퍼미딘 또는 프로필렌디아민을 포함하는 버퍼링 용액을 사용하여 본 발명의 검출 방법에서 미량의 핵산 샘플로부터 더욱 감수성으로 검출될 수 있다. 이 경우, 사용하는 엔도뉴클레아제 및 DNA 폴리머라제를 특정의 것으로 제한하지 않는다. 예를 들면, 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*), 피로코쿠스(*Pyrococcus*)속 세균 또는 아키오클로부스(*archaeoglobus*)속 세균 및 Bca BEST로부터의 RNase H의 배합물이 바람직하게 사용된다. 엔도뉴클레아제 및 DNA 폴리머라제의 바람직한 유닛수는 효소의 형태에 따라 달라질 수 있다고 예상된다. 그러한 경우, 완충액의 조성 및 첨가되는 효소의 양은 인덱스로서 증폭 산물의 양 또는 검출 감수성의 증가를 사용하여 조정될 수 있다.

본 발명의 검출 방법에서 표적 핵산의 증폭시 dUTP가 기질로서 삽입될 수 있다. 따라서, dUTP가 기질로서 사용되는 경우, 우라실 N-글리코시디아제 (UNG)를 사용하여 증폭 산물을 분해시켜 증폭 산물의 캐리-오버 (glycosidase) 오염을 방지할 수 있다.

핵산 검출을 위한 공지된 방법을 단계 (b)를 위해 사용할 수 있다. 그러한 방법의 예는 전기영동에 의해 특정 크기를 갖는 반응산물의 검출, 및 프로브와 하이브리다이제이션시키는 검출을 포함한다. 에티디움 브로마이드와 같은 형광 물질을 사용하여 전기 영동에 의한 검출에서 사용한다. 프로브를 사용하는 하이브리다이제이션을 전기영동에 의한 검출과 배합시킬 수 있다. 프로브는 방사성 동위 원소로 표지될 수 있거나 바이오틴과 같은 비-방사성 동위 원소 물질 또는 형광 물질로 표지될 수 있다. 또한, 단계 (a)에서 표지된 뉴클레오타이드를 사용하여 증폭 산물의 검출을 촉진시킬 수 있다. 또한, 형광 편광법, 형광 에너지 전이 등을 검출을 위해 사용할 수 있다. 적절한 검출 시스템을 구축하여 핵산을 자동적으로 검출하거나 측정할 수 있다. 또한 하이브리드 크로마토그래피에 의해 나안(naked eye)으로 검출하는 것이 바람직하게 사용될 수 있다.

소광 상태가 되는 거리에 위치한 두께 이상의 형광 물질로 표지된 리보뉴클레오타이드(RNA) 프로브를 본 발명의 검출 방법에 사용할 수 있다. 프로브는 형광을 발산하지 않는다. 그것이 프로브에 상보적인 핵산으로부터 증폭된 DNA에 어닐링되는 경우, RNase H가 프로브를 분해한다. 이어서, 프로브상에 형광 물질 사이에 거리를 증가시켜, 형광을 발산시킨다. 발산은 핵산의 존재를 나타낸다. RNase H를 본 발명의 핵산 증폭 방법에서 사용하는 경우, 단지 프로브를 반응 혼합물에 첨가하여 핵산을 검출할 수 있다. 예를 들면, 형광 물질, 6-카복시클루오렌(6-FAM) 및 N,N',N'-테트메틸-6-카복시로다민(TAMRA)의 혼합물을 프로브 표지용으로 바람직하게 사용할 수 있다.

본 발명은 추가로 상기 언급한 표적 핵산을 검출하는 방법에서 사용되는 프로브를 제공한다. 본 발명의 프로브는 정상 하이브리드화 조건하에서 본 발명의 핵산 증폭 방법에 의해 증폭된 표적 핵산에 하이브리드될 수 있는 한 특정의 것으로 제한하지 않는다. 증폭 산물의 특정 검출과 관련하여 조건 예를 들면, 본 분야의 기술자에게 엄격한(stringent) 조건으로 공지되어 있는 조건하에 혼성화하는 프로브가 바람직할 수 있다. 엄격한 하이브리드 조건은 예를 들면 [T. Maniatis et al. (eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory]에 기술되어 있다. 특히 엄격한 조건은 하기와 같이 예시된다: 사용되는 프로브의 Tm보다 낮은 약 25°C의 온도에서 4시간 내지 밤새도록 0.5% SDS, 5 x Denhardt's(0.1% 소혈청 알부민(BSA), 0.1% 폴리비닐피롤리돈, 0.1% Ficoll 400) 및 100 µg/ml 삶은 정자 DNA를 포함하는 6 x SSC(1 x SSC : 0.15M NaCl, 0.015M 소듐 시트레이트, pH 7.0) 용액에서 인큐베이션. 상기 기재된 바와 같은 라벨을 갖는 프로브를 표적 핵산의 검출을 촉진하는 프로브로서 사용할 수 있다.

본 발명의 등온 조건하에서 핵산 증폭 방법은 열 사이클러와 같은 장치의 사용을 필요로 하지 않는다. 본 발명의 증폭 방법에서 사용되는 프라이머의 수는 통상의 방법에서 사용되는 것보다 적은 하나 또는 둘이

다. PCR용 dNTPs 등과 같은 시약을 본 발명의 방법에 사용하기 때문에, 통상의 방법과 비교하여 러닝 코스트(running cost)를 감소시킬 수 있다. 그러므로, 본 발명의 방법은 검출을 항상 수행하는 유전자 시험을 포함하는 분야에서 바람직하게 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 PCR 방법보다 더욱 단시간에 증폭 산물을 대량으로 제공한다. 그러므로, 본 발명의 방법은 편리하고 신속하고 민감한 유전자 검출 방법으로 사용될 수 있다.

게놈 수준으로 유전자 분석에서 다량의 뉴클레오타이드 서열을 분석하기 위하여 반응 시스템을 축소화하고 통합(integration) 정도를 증가시키기 위해 시도되고 있다. 게놈 분석을 위한 기본 공정(예: 세포로부터 DNA 추출, DNA 증폭 반응, 전기영동, 하이브리드화, 관상의 대상이 되는 DNA 검출 등)을 핑거팁(fingertip) 크기로 여러 사각 센티미터의 마이크로칩상에 통합시키는 최근 초미세 공정 기술을 사용하여 상기 목적을 위해 시스템이 개발되고 있다. 그러한 시스템을 마이크로 칩 또는 나노칩으로 명명한다.

유전자 증폭 반응으로서 시스템에 PCR의 적용이 현재 고려되고 있다. 그러나, PCR은 시간에 따라 온도를 반복적으로 상하 조정하는 수단을 필요하기 때문에 시스템은 복잡할 것이다. 반대로 본 시스템은 등온 조건하에서 핵산을 증폭시킬 수 있는 본 발명의 방법을 사용하여 단순화될 수 있기 때문에 상기 기술된 바와 같이 통합 시스템을 위해 본 방법을 매우 적절하게 이용한다.

#### (7) 본 발명의 키트

본 발명은 상기 기재된 본 발명의 핵산을 증폭, 또는 검출하기 위한 키트를 제공한다. 일례에서, 키트는 패키지 형태(packaged form)이고 스트랜드 치환 반응과 관련하여 DNA 폴리머라아제 및 엔도뉴클레아제의 사용과 관련된 안내서를 포함한다. 또한, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라아제, 엔도뉴클레아제, 및 스트랜드 치환 반응을 완충액을 포함하는 키트가 본 발명의 방법에서 바람직하게 사용된다. 또한, 상업적으로 사용가능한 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라아제 및/또는 엔도뉴클레아제를 안내서에 따라 선택하고 사용할 수 있다. 또한, RNA를 주형으로서 사용하는 경우, 키트는 사용되는 역전사 반응을 시약을 포함할 수 있다. DNA 폴리머라아제는 상기 (3)에 기재된 바와 같이 본 발명에서 사용되는 DNA 폴리머라아제들로부터 선택될 수 있다. 엔도뉴클레아제는 상기 (2)에 기재된 바와 같은 엔도뉴클레아제들로부터 선택될 수 있다. 상기 (4)에 기재된 바와 같은 반응 완충액 조성을 갖는 것을 바람직하게 스트랜드 치환 반응을 완충액으로서 사용할 수 있다.

'안내서'는 키트 사용법, 예를 들면, 스트랜드 치환 반응을 시약 용액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

본 발명의 키트는 추가로 상기 (4)에 예시된 버퍼링 용액 및 완충 성분으로서 Bicine, Tricine, HEPES, phosphate 또는 tris를 포함하는 반응 완충액을 포함할 수 있다. 추가로, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라아제 및 RNase H를 포함할 수 있다. 또한 키트는 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체를 포함할 수 있다.

표적 핵산을 검출하는 방법에서 사용되는 키트는 상기 기술된 바와 같은 안내서 및 증폭 반응을 시약외에 표적 핵산을 증폭시키기 위한 적절한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 증폭된 표적 핵산을 검출하는 시약 예로서 프로브를 포함할 수 있다.

또한, 본 발명의 키트는 본 발명에서 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및/또는 상기 기재된 바와 같은 본 발명의 프로브를 포함하는 키트를 포함한다.

#### (8) 본 발명의 조성물

본 발명은 상기 기술된 본 발명의 핵산을 증폭시키는 방법 또는 본 발명의 핵산을 검출하는 방법에서 사용되는 조성물을 제공한다. 예를 들면, 조성물은 상기 (2)에 기술된 엔도뉴클레아제 및 (3)에 기술된 DNA 폴리머라아제를 포함할 수 있다. 조성물은 증폭 반응을 수행하기 위한 성분으로서 또한 완충 성분, 마그네슘 염, dNTPs 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 상기 (4)에 기술된 것은 완충 성분 및 다른 첨가체로서 사용될 수 있다.

특히 바람직한 일면으로 조성물은 본 발명의 핵산 증폭 방법을 위해 상기 나열된 다양한 성분을 적절한 양으로 포함할 수 있다. 증폭 반응은 단지 적절한 주형 및 키메라성 올리고뉴클레오타이드(들)를 조성물에 가하여 수행될 수 있다. 증폭시키고자 하는 목표물이 앞서 공지된 경우 조성물은 바람직하게 목적물을 증폭시키기 위해 적절한 키메라성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

#### (9) 본 발명의 미리 정해진 영역에 배열되고 고정화된 핵산을 갖는 물질 및 그를 제조하는 방법.

DNA 칩(또는 DNA 마이크로어레이 또는 DNA 어레이로서 언급함)은 그것에 다양한 유전자 단편 또는 DNAs가 솔라이드 글라스와 같은 고체 기질상의 미리 정해진 영역 또는 미리 정해진 위치에 배열되고 고정화된, 고정화된 핵산을 갖는 물질이다. DNA 칩은 DNA 칩상에 미리 정해진 영역에 배열되고 고정화된 DNA에 상보적인 서열을 갖는 핵산의 핵산 샘플중의 존재 여부를 조사하기 위해 사용된다. 하이브리다이제이션시키기 위해 DNA 칩을 샘플, 바람직하게 표지된 핵산 샘플로부터 제조된 핵산 샘플과 접촉시킨다. 하나의 방법에서 DNA 칩을 사용하여 샘플중의 핵산을 검출하거나 핵산의 수를 측정할 수 있기 때문에, 그것은 유전자 발현 분석, 또는 돌연 변이 또는 다형(polymorphism)의 분석을 매우 효과적으로 촉진시키는 유용한 방법이다. 더블-스트랜드 핵산이 미리 정해진 영역에 배열되고 고정화된 DNA 칩은 적절히 변형시킨 후에 하이브리다이제이션을 위해 사용한다. 검출되는 핵산에 상보적인 싱글-스트랜드 DNA가 미리 정해진 영역에 배열되고 고정화된 DNA 칩이 핵산 검출용으로 특히 바람직할 수 있다.

상기 기재된 바와 같이, 원하는 DNA를 본 발명의 방법에 의해 싱글-스트랜드 형태로 증폭시킬 수 있다. 증폭 산물을 정제시키는 어느 방법도 사용될 수 있지만, 미소프로판올 침전을 사용하는 정제법이 바람직할 수 있다. 그렇게 수득한 DNA, 바람직하게 실질적으로 그의 상보적 스트랜드가 없는 싱글-스트랜드 DNA를 바람직하게 DNA 칩상에 고정하고자 하는 DNA 단편으로서 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법을 DNA 칩을 생산하기 위해 미리 정해진 영역에 배열되고 고정하고자 DNA를 제조하는 방법으로서 바람직하게 사용한다. 어느 용융성 기질도 그렇게 수득한 DNA를 그것위에 미리 정해진 영역에 배열하고 고정화하는 기질로서 사용할 수 있지만, 글래스 또는 플라스틱으로부터 제조된 플레이트-형태의 기질, 및 니트로셀룰로오스 또는 나일론으로부터 제조된 막-형태의 기질을 바람직하게 사용한다. 고정화시키는 공지된 방법을 사용하여 핵산을 고정화시킬 수 있다. DNA는 그대로 기질상의 고정화될 수 있다. 또한, DNA는 적절한 링커(linker)를 통해 고정화될 수 있거나 다수의 DNA 분자를 결합(ligating)시켜 고정화될 수 있다. 또한, 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드는 본 발명의 생산 방법에 의해 증폭된 핵산 내로 삽입될 수 있기 때문에 고정화된 핵산을 갖는 물질은 변형 그룹을 사용하여 생산될 수 있다.

본 발명의 방법에 의해 증폭된 DNA가 미리 정해진 영역에 배열되고 고정화될, 고정화된 핵산을 갖는 물질(예: DNA 칩)상에서 핵산과 하이브리다이제이션되는 핵산을 검출 또는 측정할 수 있다. 그러한 검출 또는 측정은 핵산을 함유할 것으로 예상되는 샘플로부터 제조된 핵산 샘플과 물질을 접촉시켜 하이브리다이제이션시켜 수행될 수 있다. 이를 용에서, 본 발명의 방법에 의해 증폭된 싱글-스트랜드 DNA가 미리 정해진 영역에 배열되고 고정화된 DNA 칩은 통상의 물질과 비교하여 더욱 편리하고 높고감도 및 더욱 높은 생산력으로 핵산을 검출할 수 있게 한다.

#### (10) 본 발명의 핵산을 대량으로 생산하는 방법

상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 일면은 등온 조건하에서 수행될 수 있는 핵산 증폭 방법을 제공한다. 증폭되는 핵산을 위해 주형으로서 핵산 및 반응을 위해 필요한 다양한 성분을 혼합하고 등온 조건하에서 혼합물을 반응시키는 방법에 의해 바람직한 핵산을 생산할 수 있다. PCR 방법은 시간동안 반응 혼합물의 온도를 변화시켜야 하기 때문에, 온도를 조정할 수 있는 반응 용량(일반적으로, 200 $\mu$  이하)의 것으로 제한된다. 그러므로, 용량을 증가시키는 것은 어렵다. 한편, 본 발명의 방법에서는 그러한 제한은 없다. 반응 혼합물의 용량을 증가시켜 다량의 핵산을 생산할 수 있다. 본 발명의 방법에서 용량은 예를 들면 바람직하게 200 $\mu$  이상, 더욱 바람직하게 300 $\mu$  이상 가장 바람직하게 500 $\mu$  이상이고 이는 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 발명의 방법에서 다수의 상보적 스트랜드 분자를 하나의 주형 분자로부터 합성한다. 또한, 주형을로서 이를 상보적 스트랜드 분자들을 사용하여 핵산을 합성할 수 있다. 따라서, 적절한 하에 주형 및 프라이머를 선택하여 원하는 핵산을 효율적으로 대량 생산할 수 있다. 또한, PCR 방법과는 달리, 본 발명의 방법은 특정 장치 또는 복잡한 온도 변화를 요구하지 않는다는 사실이 장치 및 에너지 비용과 관련하여 그것을 이롭게 한다. 그러므로, 상기 방법은 핵산을 대량 생산하는 산업상 우수한 방법이다.

관심의 대상이 되는 핵산은 (4)에 예시된 것과 같은 반응 완충액 및 어닐링 용액을 사용하여 본 발명의 검출 방법에서 미량의 핵산으로부터도 증폭되거나 생산될 수 있다. 이 경우, 사용하는 엔도뉴클레아제 및 DNA 폴리머라제를 특정한 것으로 제한하지 않는다. 예를 들면, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 및 Bca BEST로부터의 RNase H의 배합물이 바람직하게 사용된다. 엔도뉴클레아제 및 DNA 폴리머라제의 바람직한 유닛수는 효소의 형태에 따라 달라질 수 있다고 예상된다. 그러한 경우, 완충액의 조성 및 첨가되는 효소의 양은 인덱스로서 증폭 산물의 양 또는 검출 감수성의 증가를 사용하여 조정될 수 있다.

또한, 본 발명의 방법은 DNA 칩상에 고정하고자 하는 것과 같은, 다양한 DNA 단편을 대량 공급하는 방법으로서 유용하다. 특히, 일례에서 DNA 단편을 단순 반응 단계에서 대량 수득할 수 있다. 또다른 일례에서, 제한된 수의 프라이머들을 사용하여 다양한 DNA 단편을 수득할 수 있다. PCR 방법과 같은 공지된 핵산 증폭 방법에 의해 앞서 본 발명의 방법에서 주형으로서 작용하는 핵산을 증폭시키는 단계를 이후의 일례에서 인용할 수 있다. 예를 들면, 태그 서열을 갖는 무작위 프라이머를 사용하여 핵산을 증폭시키는 방법(Nucleic Acids Research, 24(19):3778-3783(1996)) 또는 숙된 프라이머를 사용하는 숙된-올리고뉴클레오타이드-프라이머 PCR(OOP-PCR, Genomics, 13:718-725(1992))에 기초하여, 주형으로서 모든 종류의 핵산을 제한된 수의 프라이머를 사용하여 증폭시킬 수 있다. 주형으로서 상기 언급된 단계에서 제조된 모든 핵산에 대한 일부의 프라이머를 하나를 사용하여 본 발명의 핵산 증폭 방법을 수행할 수 있다. 이것은 그것을 무작위 또는 숙된 프라이머에 첨가된 태그 서열에 일치시키기 위해 본 발명의 증폭 방법에서 사용되는 프라이머를 디자인하여 수행될 수 있다. 따라서, 주형으로서 핵산을 제조하는 적절한 단계 및 본 발명의 방법을 결합시킴으로써 통상의 방법과 비교하여 더욱 저렴한 비용으로 다양한 DNA 단편을 대량 공급할 수 있다.

핵산을 포함하는 약제학적 조성물은 세포종에서 유용한 폴리펩티드를 발현시키는 더블-스트랜드 DNA 또는 관심의 대상이 되는 유전자의 발현을 억제하는 싱글-스트랜드 안티센스 DNA를 포함할 수 있다. 적절한 방법, 예를 들면, 리보솜과 같은 유전자 전달용 전달체를 사용하여 그러한 핵산을 유도체체로 투여한다. 의료용 싱글-스트랜드 또는 더블-스트랜드 핵산을 대량 생산하기 위해 본 발명의 핵산 제조 방법이 바람직할 수 있다. 또한, 예를 들면, 생체내에서 핵산의 축적을 억제시키는, dNTP 유사체를 포함하는 핵산을 본 발명의 방법에 의해 용이하게 생산할 수 있다.

본 발명에서 증폭된 DNA 단편은 표준의 뉴클레오타이드로 구성되기 때문에, DNA중에 제한효소 부위를 사용하여 증폭된 DNA는 적절한 벡터내로 서브클로닝될 수 있다. 또한, 예를 들면, DNA는 별 문제없이 RFLP용 제한 효소로 처리될 수 있다. 그러므로, DNA는 유전자 시험 분야에서 광범위하게 사용될 수 있다. 또한, RNA 폴리머라제를 위한 프로모터 서열을 증폭된 단편내로 혼입시킬 수 있다. 예를 들면, 증폭된 단편을 주형으로서 사용하여 프로브로서 사용할 수 있는 RNA를 합성할 수 있다. 물론, 표준 dNTP를 대신하여 형광-표지된 dNTP를 사용하여 본 발명의 뉴클레오타이드 증폭 방법을 수행하여 형광-표지된 DNA 프로브를 생산할 수 있다.

본 발명의 방법에서 최종적으로 증폭된 단편이 양단에 증폭용 프라이머에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖지 않기 때문에, 증폭 산물의 캐리-오버(carry-over)에 기인하는 오염을 줄일 수 있다. 그러므로, 본

발명의 방법은 동일한 영역을 계속하여 증폭시키는 유전자 시험 등에서 유용하다.

본 발명의 핵산 증폭 방법의 특징을 하기에 나열한다.

1. 소량의 주형으로부터 다량의 핵산을 증폭시킬 수 있다. 두개의 프라이머를 사용하는 경우 증폭 산물은 2차 함수적으로 증가한다.
2. 등온으로 수행될 수 있다. 이러한 경우, 열 싸이클러와 같은 장치의 사용을 필요로 않는다. 그러므로, 반응 용량을 용이하게 증가시킬 수 있다.
3. 일반적으로, 하나 또는 두개의 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 주개의 효소(DNA 폴리머라제 및 엔도뉴클레아제)를 사용하여 증폭 반응을 수행한다.
4. 다수의 DNA 스트랜드가 한 분자의 프라이머로부터 합성될 수 있기 때문에, 프라이머의 양이 증폭 산물의 양을 제한하지 않는다. 또한, 프라이머 사용 효율은 PCR 방법의 것과 비교하여 더욱 높은 약 100%이다.
5. 목적에 따라 싱글-스트랜드 또는 더블-스트랜드를 선택적으로 증폭시킬 수 있다.
6. 그것은 증폭 반응을 위해 ( $\alpha$ -S) dNTP와 같은 dNTP 유사체를 필요로 하지 않기 때문에, 시약의 비용은 저렴하다. 또한, dNTP 유사체 없이 천연 형태의 핵산을 수득할 수 있다.
7. 본 발명의 방법을 또다른 핵산 복제 방법과 결합하여 저렴한 비용으로 증폭된 DNA 단편을 다량 공급할 수 있다.
8. 본 발명은 핵산의 증폭, 자동화된 검출, 마이크로칩 또는 나노칩상에서의 소량 검출 및 고도로 통합된 검출에 적절하다.

상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 방법은 상업상 핵산을 생산하는 것이 적절하다.

### 실시예

본 발명을 실시예에 따라 더욱 구체적으로 설명하며, 본 발명은 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

참고예 1: 호열성 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNase H 제조

바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*) YT-8 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen로부터 구입; DSM406)를 0.2% Trytone(Difco Laboratories) 및 1.5% 효모 추출액(Difco Laboratories)을 포함하는 100 ml의 배지에 접종하고, 진탕시키면서 140분동안 60°C에서 배양하고 예비-배양액으로서 사용하였다. 30ml의 예비-배양액을 동일한 조성물을 갖는 3L의 배지에 접종하고 2.5L/분에서 에어레이션을 시키면서 5시간동안 60°C의 온도에서 250rpm으로 교반하면서 배양하였다.

세포를 원심분리에 의해 회수하고 15분동안 5000 x g에서 배양하였다. 402g(습윤상태의 중량)의 세포를 10 mM 머캅토에탄올, 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1mM EDTA 및 20  $\mu$ M PAPMSF를 포함하는 1000ml의 50mM tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 현탁시키고 MINI-Lab(APV GAULIN/RANNIE)를 사용하여 파열시켰다. 세포 브리스를 원심분리에 의해 제거하고 상층액을 수득하였다.

폴리에틸렌 이민 용액을 0.1%의 최종 농도로 생성된 상층액에 가하였다. 교반한 후, 혼합물을 1시간동안 방치시켰다. 이어서 상층액을 원심분리에 의해 회수하였다. 황산암모늄을 50% 포화도로 상층액에 가하였다. 원심분리에 의해 수득한 침전물을 10 mM 머캅토에탄올, 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 20mM tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 용해시켰다. 용액을 동일한 완충액에 대하여 투석시켰다. 투석된 샘플을 동일한 완충액으로 평형화된 280-ml DE52 랫폼(Whatman)상에 로딩하고 비-흡착성 분획을 회수하였다.

랫폼을 추가로 평형화에 사용된 420ml의 완충액으로 세척하고 세척 분획을 회수하였다. DE52 랫폼 크로마토그래피로부터의 비-흡착성 분획 및 세척 분획을 혼합하고 10 mM 머캅토에탄올, 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 20mM tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화된 20 mM tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화된 240-ml P-11 랫폼 크로마토그래피(Whatman)상에 로딩하였다. 이어서 0 내지 0.5M NaCl을 포함하는 평형 완충액을 사용하여 용출시켰다.

생성된 활성 분획을 투석 튜브에 놓았다. 튜브를 4°C에서 탈수-농축을 위해 고체 폴리에틸렌 글리콜 20000상에 놓았다. 이어서 효소 농축물을 5 mM 머캅토에탄올, 0.5 mM EDTA, 30 mM NaCl 및 50% 글리세롤을 포함하는 25mM tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화된 300 mM Superdex 8-2000 랫폼(Amersham Pharmacia Biotech)상에 로딩하였다. 평형에 사용된 완충액을 사용하여 용리시켜 활성 분획을 수득하였다. 활성 분획을 10 mM 머캅토에탄올, 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 20mM tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화된 15-ml 헤파린-세파로스 랫폼(Amersham Pharmacia Biotech)상에 로딩하였다. 이어서 0 내지 0.5M NaCl을 포함하는 평형 완충액을 사용하여 용출시켰다.

생성된 활성 분획을 10 mM 머캅토에탄올, 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 20mM tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화된 5-ml Hicap-SP 랫폼(Amersham Pharmacia Biotech)상에 로딩하였다. 이어서 0 내지 0.5M NaCl을 포함하는 평형 완충액을 사용하여 용출시켰다. 생성된 활성 분획을 5 mM 머캅토에탄올, 0.5 mM EDTA, 30 mM NaCl 및 50% 글리세롤을 포함하는 25mM tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화된 5-300-ml Superdex 8-200 랫폼(Amersham Pharmacia Biotech)상에 다시 로딩하였다. 생성된 활성 분획을 RNase H 샘플(효소 용액)으로 사용하였다.

열-내성 RNase H 활성을 하기와 같이 측정하였다:

1 mg의 poly(rA) 또는 poly(dT) (Amersham Pharmacia Biotech로부터 모두 입수)를 1 mM EDTA를 포함하는



1 ml의 40 mM tris-HCl (pH 7.7)에 용해시켜 poly(rA) 용액 및 poly(dT) 용액을 제조하였다.

poly(rA) 용액(20 µg/ml의 최종 농도) 및 poly(dT)(30 µg/ml의 최종 농도)를 이어서 4mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0.003% BSA 및 4% 글리세롤을 포함하는 40mM tris-HCl 완충액(pH 7.7)에 가하였다. 혼합물을 10분동안 37 °C에서 반응시킨 후 4°C으로 냉각시켜 poly(rA) 용액-poly(dT) 용액을 제조하였다.

1 µl의 효소 용액을 100 µl의 poly(rA) 용액-poly(dT) 용액에 가하였다. 혼합물을 40°C에서 10분동안 반응시켰다. 10 µl의 0.5M EDTA를 가하여 반응을 종결시켰다. 260nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로서 10 µl의 0.5M EDTA를 가하고 생성된 혼합물을 10분동안 40°C에서 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. EDTA가 존재하지 않은 반응에서의 흡광도로부터 대조군의 흡광도를 감하여 값(흡광도 차)을 수득하였다. 따라서, 효소 반응에 의한 poly(rA)-poly 하이브리드로부터 유리된 뉴클레오타이드의 농도를 흡광도 차에 기초하여 측정하였다. 1 유닛의 RNase H는 하기 식에서 계산되는 10분후 1nmol의 리보뉴클레오타이드의 유리에 상응하여 A<sub>260</sub>를 증가시키는 효소의 양으로 정의된다. 회색된 효소 용액을 사용하는 경우 하기 식을 상요하여 얻은 값은 회색함에 기초하여 보정되었다:

유닛 = [흡광도 차 × 반응 용량(ml)] / 0.0152

참고 실시예 2: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldoflex*) RNase HII 유전자의 클로닝

#### (1) 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldoflex*)로부터 게놈 DNA 제조

바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldoflex*) YT-6 (DSM406)를 60ml의 LB 배지(1% Trytone, 0.5% 효모 추출액 및 0.5% NaCl, pH 7.2)에 접종하고, 20시간동안 배양하였다. 배양후 배양액을 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포를 2ml의 25% 수크로오스 및 50mM tris-HCl(pH 8.0)에 현탁시켰다. 용중 0.2ml의 10mg/ml의 리소자임 클로리드(Nacalai Tesque)를 가하였다. 혼합물을 1시간동안 20°C에서 반응시켰다. 반응후, 150mM NaCl, 1mM EDTA 및 20mM tris-HCl(pH 8.0), 0.1ml의 20mg/ml 프로테이나제 K(Takara Shuzo) 및 1ml를 10% 소듐 라우릴 설페이트 수용액을 포함하는 12ml의 혼합물을 반응 혼합물에 가하였다. 혼합물을 1시간동안 37°C에서 인큐베이션시켰다.

2.1ml의 5M NaCl 및 2ml의 CTAB-NaCl 용액(10% 세틸트리메틸 암모늄 브로마이드(Nacalai Tesque) 및 0.7M NaCl)를 혼합물에 가하여 생성된 혼합물을 완전히 혼합하고 10분동안 65°C에서 인큐베이션시켰다. 동량의 클로로포름/이소아밀 알콜의 혼합물(24:1, v/v)을 가하였다. 생성된 혼합물을 10분동안 서서히 혼합하고 10000 × g에서 10분동안 65°C에서 인큐베이션시켰다. 원심분리후, 동량의 100mM tris-HCl(pH 8.0)으로 포화된 페놀/클로로포름/이소아밀 알콜의 혼합물(25:24:1, v/v)을 생성된 상층액에 가하였다. 0.6 용량의 2-프로판올을 생성된 상층액에 가하였다. 생성된 섬유성 침전물을 글라스 바를 사용하여 감고, 용중 70% 에탄올로 세척하고 공기-건조시킨 후 0.5ml의 TE 완충액에 용해시켜 게놈 DNA 용액을 수득하였다.

#### (2) RNase HII 유전자의 중간 부위 클로닝

서열번호 1 및 2로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 BsuII-3 및 BsuII-6를 다양한 유기체(Biochemistry, 38:605-608 (1999))로부터 RNase HII의 아미노산 서열중 보존되는 부위인 Motif I 및 Motif III에 기초하여 합성하였다.

주형으로서 참고 실시예 (2)-1에서 제조된 것과 같은 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldoflex*) 게놈 DNA 용액 1 µl, 및 프라이머로서 100pmol의 BsuII-3 및 100pmol의 BsuII-6 을 사용하여 PCR을 100 µl로 수행하였다. TaKaRa Taq 폴리머라제(Takara Shuzo)를 첨부된 프로토콜에 따른 PCR용 DNA 폴리머라제로서 사용하였다. PCR을 하기와 같이 수행하였다: 30초동안 94°C, 30초동안 45°C, 1분동안 72°C에서 50사이클. 반응 후, 반응 혼합물을 페놀로 처리하여 에탄을 침전시켜 DNA를 정제하였다. 생성된 DNA를 T4 DNA 폴리머라제(Takara Shuzo)를 사용하여 말단을 둔화(blunt-ended)시키고 아가로스 겔 전기영동시켜 겔로부터 약 0.4kb의 증폭된 DNA 단편을 회수하였다. 약 0.4kb의 DNA 단편을 사용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109로 형질전환시켰다. 생성된 형질전환체를 배양하여 0.4kb의 DNA가 삽입되는 플라스미드 21-12를 수득하였다.

#### (3) RNase HII 유전자의 상류 부위 클로닝

참고 실시예 2-(2)에서 수득한 플라스미드 21-12에 0.4kb의 삽입된 단편의 뉴클레오타이드 서열을 결정하였다. 서열번호 3 및 4로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 RNI-S1 및 RNI-S2를 결정된 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다.

참고 실시예 2-(1)에서 제조된 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldoflex*) 게놈 DNA 를 BamHI(Takara Shuzo)로 분해하고 T4 DNA 폴리머라제를 사용하여 Sau3AI 카세트(Takara Shuzo)로 결합시켰다. 시험관내 클로닝 키트(Takara Shuzo)내 TaKaRa LA PCR에 첨부된 프로토콜에 따라 주형으로서 결합 혼합물, 1차 PCR용 프라이머로서 RNI-S2 및 2차 PCR용 프라이머로서 RNI-S1을 사용하여 공정을 수행하였다. 2차 PCR후 페놀 추출에 의해 DNA를 용액으로부터 정제한 후 에탄을 침전시켰다. DNA를 T4 DNA 폴리머라제를 사용하여 말단을 둔화시키고 아가로스 겔 전기영동시켜 겔로부터 약 1.5kb의 증폭된 DNA 단편을 회수하였다. 약 1.5kb의 DNA 단편을 사용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109로 형질전환시켰다.

생성된 형질전환체를 배양하여 약 1.5kb의 DNA가 삽입된 플라스미드 B25N16를 수득하였다.

#### (4) 전장 RNase HII 유전자의 클로닝

참고 실시예 2-(3)에서 확인된 플라스미드 21-12에 0.4kb의 삽입 단편의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 서열번호 5 및 6으로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 RNI-S5 및 RNI-S6를 합성하였다.

주형으로서 참고 실시예 2-(2)에서 제조된 플라스미드 21-12, 및 프라이머로서 RNI-S5 및 RNI-S6를 사용하여 PCR을 수행하였다. TaKaRa EX Taq 폴리머라제(Takara Shuzo)를 첨부된 프로토콜에 따른 PCR용 DNA 폴리머라제로서 사용하였다. PCR을 하기와 같이 수행하였다: 30초동안 94°C, 30초동안 55°C, 30초동안 72°C에서 25사이클. 반응 후, 반응 혼합물을 아가로스 겔 전기영동시켰다. 약 0.3kb의 증폭된 DNA 단편을



겔로부터 회수하였다. 약 0.3kb의 DNA 단편을 DIG-프라이머(Roche Diagnostics)를 사용하여 다이옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하였다.

HindIII (Takara Shuzo), SacI (Takara Shuzo), 또는 HindIII 및 SacI을 사용한 참고 실시예 2-(1)에서 제조된 바실러스 할도테넥스(*Bacillus halodotensis*) 게놈 DNA의 분해물에 대하여 프로브로서 다이옥시제닌-표지된 DNA를 사용하여 서던 하이브리드화하였다. 하이브리드화 및 검출은 첨부된 프로토콜에 따라 DIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics)를 사용하여 수행하였다. 결과 약 4.5 kb, 약 5.8 kb 및 약 1.3 kb의 DNA 단편이 각각 HindIII, SacI, 및 HindIII 및 SacI을 사용한 분해물에 대하여 프로브와 하이브리드하였다.

이 결과에 기초하여, 바실러스 할도테넥스(*Bacillus halodotensis*) 게놈 DNA를 HindIII로 분해하고 마가로스 겔 전기영동시켜 겔로부터 약 4.5 kb DNA를 회수하였다. 생성된 DNA 단편을 SacI로 분해하고 마가로스 겔 전기영동시켜 겔로부터 약 1.3 kb DNA를 회수하였다. 생성된 DNAs를 T4 DNA 리가제를 사용하여 HindIII 및 SacI으로 분해된 pUC19 (Takara Shuzo)와 결합시켰다. 결합 혼합물을 사용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HB101을 형질전환시켰다.

생성된 형질전환체를 Hybond-NM (Amersham Pharmacia Biotech)상에 리플리카-플레이팅(replica-plated)시켰다. 이어서 통상의 방법에 따라 디옥시제닌-표지된 프로브를 사용하여 콜로니 하이브리드화를 수행하였다. 그렇게 수득된 양성 클론으로부터 플라스미드 pRH1을 제조하였다.

pRH1내로 삽입된 DNA의 뉴클레오타이드 서열을 확인하였다. 뉴클레오타이드 서열로부터 유도된 아미노산 서열을 바실러스 서틸러스(*Bacillus subtilis*)로부터의 아미노산 서열과 비교하여 개시 코돈으로부터 약 40bp 부위가 pRH1 DNA에서 결손(missing)되어 있음을 제안하였다. 이어서 전장의 RNase H 유전자를 하기와 같이 삭제하였다.

참고 실시예 2-(3)에서 제조된 B25N16를 HindIII로 분해하고 마가로스 겔 전기영동시켜 겔로부터 약 160bp의 DNA 단편을 회수하였다. 약 160bp의 DNA 단편을 T4 DNA 리가제를 사용하여 HindIII 분해된 pRH1와 결합시켰다. 결합 혼합물을 사용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HB101을 형질전환시켰다. 생성된 형질전환체로부터 플라스미드를 제조하였다.

이어서, 서열번호 7로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 RN1-Nde를 개시코돈 주위의 가정의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다. PCRs를 주형으로서 형질전환체로부터 제조된 플라스미드, 및 프라이머로서 RN1-Nde 및 RN1-S6를 사용하여 수행하였다. 약 0.7kb의 DNA 단편이 증폭되는 플라스미드를 선별하고 pRH1로서 삭제하였다.

그렇게 수득된 플라스미드 pRH1내로 삽입된 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열을 확인하였다. 결과를 분석하여 RNase H1을 코딩할 것으로 가정한 오픈 리딩 프레임 밝혀냈다. 이 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 8에 나타낸다. 뉴클레오타이드 서열로부터 유도된 RNase H1의 아미노산 서열은 서열번호 9에 나타낸다.

플라스미드 pRH1로 형질전환된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HB101을 삭제하고 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109/pRH1로 지정하고 2000년 9월 6일(원 기탁일)에 수탁번호 FERM BP-7655로 International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central(6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8565)에 기탁하였다.

#### (5) 바실러스 할도테넥스(*Bacillus halodotensis*) H1 유전자의 발현

pRH1 또는 pRH1로 형질전환된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HB101을 100 µg/ml의 앰피실린을 포함하는 5ml의 LB 배지내로 접종하고 37°C에서 밤새도록 진탕시키면서 배양하였다. 배양후, 원심분리에 의해 회수한 세포를 0.5ml의 TE 완충액에 현탁시키고 초음파처리하였다. 원심분리에 의해 수득한 상층액을 사용하여 세포 원(crude) 추출물로서 사용하였다.

10mM tris-HCl(pH 8.0), 1mM 디티오프로판티올(Nacalai Tesque), 0.003% 소 혈청 알부민(분획 V, Sigma), 4% 글리세롤, 20 µg/ml poly(dI)(Amersham Pharmacia Biotech) 및 30 µg/ml poly(rA)(Amersham Pharmacia Biotech)를 함께 혼합하였다. 혼합물을 10분동안 37°C에서 인큐베이션시키고 RNase H 활성 측정을 위한 기질 용액으로서 사용하였다.

1 µl의 1M MnCl<sub>2</sub>의 100 µl의 기질 용액에 가하였다. 혼합물을 40°C에서 인큐베이션시켰다. 10 µl의 세포 원추출물의 10배 희석액을 혼합물에 가하여 반응을 개시시켰다. 30분동안 40°C에서 반응시킨 후, 10 µl의 0.5M EDTA를 가하여 반응을 종결시켰다. 260nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과, pRH1를 포함(harboring)하는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HB101로부터 제조된 세포 원추출액을 사용한 반응으로부터의 260nm에서의 흡광도가 pRH1를 포함하는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HB101로부터 제조된 세포 원추출액을 사용한 반응으로부터의 260nm에서의 흡광도보다 고도로 높았다. 따라서, pRH101 RNase H를 포함하고 pRH1를 포함하는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)가 RNase H 활성을 발현시킨다는 것이 입증되었다.

#### (6) 정제된 RNase H1 샘플의 제조

참고 실시예 2-(4)에서 수득된 pRH1로 형질전환된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HB101을 100 µg/ml의 앰피실린을 포함하는 1L의 LB 배지내로 접종하고 37°C에서 16시간동안 진탕시키면서 배양하였다. 배양후, 원심분리에 의해 회수한 세포를 52.3% 초음파 처리 완충액[50mM tris-HCl(pH 8.0), 2mM 2-머캅토에탄올, 10% 글리세롤, 2mM 페닐메탄설포닐 플루오라이드]에 현탁시키고 초음파처리하였다. 10분동안 12000rpm에서 초음파 처리된 현탁액을 원심분리하여 수득한 상층액을 15분동안 60°C에서 가열하였다. 10분동안 다시 12000rpm에서 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 따라서, 50.0ml의 가열된 상층액을 수득하였다.

용액을 완충액 C[50mM tris-HCl(pH 8.0), 2mM 2-머캅토에탄올, 10% 글리세롤]으로 평형화한 RESOURCE Q

칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용하고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 크로마토그래피하였다. 결과, RNase H는 RESOURCE Q 칼럼을 통해 이동(flow)하였다. 51ml의 이동(flow-through) RNase H 분획을 완충액 C으로 평형화된 RESOURCE Q 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 0 내지 500mM NaCl의 선형 구배로 용출시켰다. 약 240mM NaCl로 용출된 RNase H를 포함하는 분획을 수득하였다. 30ml의 RNase H 분획을 50mM NaCl을 포함하는 완충액 C으로 평형화된 PD-10 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 2부분으로 적용시켰다. 7.0ml의 생성된 용출액을 50mM NaCl을 포함하는 완충액 C으로 평형화된 HiTrap-heparin 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 0 내지 550mM NaCl의 선형 구배로 용출시켰다. 약 310mM NaCl로 용출된 RNase H를 포함하는 분획을 수득하였다. 4.4ml의 RNase H 분획을 한외여과에 의해 Centricon-10(Amicon)을 사용하여 농축시켰다. 280  $\mu$ l의 농축액을 100mM NaCl 및 0.1mM EDTA를 포함하는 50mM Tris-HCl(pH 8.0)로 평형화된 Superdex 20 겔 여과 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 동일한 완충액으로 용출시켰다. 결과 RNase H가 분자량 35 킬로달톤에 상응하는 위치에서 용출되었다. 이 분자량은 모노머 형태의 RNase H의 것과 일치한다. 따라서 용리된 RNase H를 Bca RNase 샘플로서 사용하였다.

수득한 Bca RNase 샘플의 효소 활성을 하기와 같이 측정하였다.

40°C에서 인큐베이션된 100  $\mu$ l의 반응 혼합물[20mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 0.001% 소 혈청 알부민(Takara Shuzo), 1% 디메틸 설페이드, 10mM 염화마그네슘, 20  $\mu$ g/ml poly(dI)(Amersham Pharmacia Biotech) 및 30  $\mu$ g/ml poly(rA)(Amersham Pharmacia Biotech)를 Bca RNase HII 샘플에 가하였다. 혼합물을 10분동안 40°C에서 반응시켰다. 이어서 0.5M EDTA(pH 8.0)를 가하여 반응을 종결시켰다. 260nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과, RNase H 활성을 Bca RNase HII 샘플에 대하여 관찰하였다.

참고 실시예 3: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldoteanax*) RNase HIII 유전자 클로닝

(1) Cloning of 단편 of RNase HIII 유전자

바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) [Biochemistry, 38: 605-608(1999)] 및 다른 유기체로부터의 RNase HIII의 아미노산 서열사이의 상동성에 기초하여 확인된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) [Biochemistry, 38: 605-608(1999)] 및 다른 유기체 사이에 잘 보존되는 부위의 아미노산 서열에 기초하여 RNase HIII를 코딩하는 유전자를 스크리닝하기 위하여 서열번호 10 내지 13에 나타난 프라이머 BsuIII-1, BsuIII-3, BsuIII-6 및 BsuIII-8를 합성하였다.

주형으로서 참고 실시예 (2)-1에서 제조된 것과 같은 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldoteanax*) 게놈 DNA 200ng, 및 프라이머로서 100pmol의 BsuIII-1 및 100pmol의 BsuIII-8를 사용하여 1차 PCR을 50  $\mu$ l의 용량으로 수행하였다. 이어서 주형으로서 1  $\mu$ l의 반응 혼합물, 및 프라이머로서 100pmol의 BsuIII-3 및 100pmol의 BsuIII-6를 사용하여 2차 PCR을 100  $\mu$ l의 용량으로 수행하였다. TaKaRa Taq 폴리머라제(Takara Shuzo)를 첨부된 프로토콜에 따라 2회의 PCR을 위한 DNA 폴리머라제로서 사용하였다. PCR을 하기와 같이 수행하였다: 30초동안 94°C, 30초동안 45°C, 1분동안 72°C에서 25사이클(1차 PCR) 또는 30사이클(2차 PCR).

약 450bp의 증폭된 DNA 단편을 T4 DNA 폴리머라제(Takara Shuzo)를 사용하여 말단을 둔화(blunt-ended)시키고 아가로스 겔 전기영동시켜 약 450bp의 증폭된 DNA 단편을 회수하였다. 약 450bp의 DNA 단편을 T4 DNA 리가아제(Takara Shuzo)를 사용하여 Sma I(Takara Shuzo)로 분해된 pUC119(Takara Shuzo)와 결합시켰다. 결합 혼합물을 사용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109로 형질전환시켰다. 생성된 형질전환체를 배양하여 약 450bp의 DNA 단편이 삽입된 플라스미드 pBCA3204를 수득하였다.

(2) 서던 하이브리드화 방법을 사용한 RNase H 유전자의 클로닝

참고 실시예 (3)-1에서 수득한 pBCA3204에 삽입된 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열을 확인하였다. 서열번호 14 및 15로 나타난 프라이머 RNIII-S3 및 BcaRNIII-3를 확인된 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 확인하였다. 주형으로서 pBCA3204 및 프라이머로서 100  $\mu$ l의 RNIII-S3 및 BcaRNIII-3를 사용하여 PCR을 100  $\mu$ l의 용량으로 수행하였다. PCR을 하기와 같이 수행하였다: 0초동안 98°C, 0초동안 55°C, 20초동안 72°C에서 30사이클. 반응 후, 반응 혼합물을 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전 및 아가로스 겔 전기영동시켜 겔로부터 약 0.4kb의 DNA 단편을 회수하였다. 약 0.4kb의 DNA 단편을 DIG DNA Labeling Kit(Boehringer Mannheim)을 사용하여 라벨링하여 프로브를 제조하였다.

20  $\mu$ g의 참고 실시예 2-(1)에서 제조된 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldoteanax*) 게놈 DNA를 BamHI, EcoRI, HindIII, PstI 또는 XbaI(Takara Shuzo)로 완전하게 분해하였다. 각 분해물의 반응 아가로스 겔 전기영동시켰다. DNA를 아가로스 겔로부터 0.4N 수산화나트륨을 사용하여 나일론 막으로 이동시켰다. 30 ml의 하이브리드화 완충액[43.4g/L 염화나트륨, 17.6g/L 시트르산나트륨, 1% 차단제(Boehringer Mannheim), 0.1% N-라우로일 사코신, 0.02% 소듐 라우릴 설페이트(SDS)]를 포함하는 용입된 백에서 4시간 동안 60°C에서 예비-인큐베이션시킨 후 프로브를 포함하는 5ml의 하이브리드화 완충액을 포함하는 용입된 백에서 16시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다.

막을 0.1% SDS를 포함하는 50ml의 2 x SSC(17.5g/L NaCl, 8.6g/L 시트르산나트륨)중에서 실온에서 2회,

0.1% SDS를 포함하는 50ml의 2 x SSC(4.3g/L NaCl, 1.9g/L 시트르산나트륨)중에서 45°C에서 2회 세척하였다. 이어서, 프로브에 상보적인 서열을 갖는 약 8kb의 EcoRI 단편, 약 4.5kb의 PstI 단편, 약 1kb의 HindIII 단편을 DIG 핵산 검출 키트(Boehringer Mannheim)를 사용하여 검출하였다.

PstI로 완전하게 분해된 남은 반의 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldoteanax*) 게놈 DNA를 아가로스 겔 전기영동시켰다. 약 4.5kb의 PstI 단편을 겔로부터 회수하였다. 이어서 DNA 단편을 PstI로 분해되고, 알칼리성 포스포타제(Takara Shuzo)로 말인산화된 플라스미드 벡터 pTV119N으로 결합시켰다. 결합 혼합물을 사용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HB109를 형질전환시켰다.

주형으로서 플로니중 하나, 및 프라이머로서 RN111-3 및 BcaRN111-3을 사용하여 50 µl의 용량으로 PCR을 수행하여 RNase H 유전자를 포함하는 것으로 가정된 플로니를 선별하였다. TaKaRa-Z Taq(Takara Shuzo)를 첨부된 프로토콜에 따라 PCR을 위해 DNA 폴리머라제로서 사용하였다. PCR을 하기과 같이 수행하였다: 0초 동안 98°C, 0초 동안 55°C, 20초 동안 72°C에서 30사이클. 결과 관심의 대상이 되는 유전자가 플로니 88번에 포함되어 있다는 것을 발견하였다.

주형으로서 플로니 88번, 및 프라이머 쌍 RN-N(Takara Shuzo) 및 BcaRN111-3 또는 프라이머 쌍 M4(Takara Shuzo) 및 RN111-S3으로부터 제조된 플라스미드를 사용하여 PCR을 수행하여 전장 RNase H111 유전자가 플라스미드에 포함되어 있는지 여부를 조사하였다. 결과, 전장 RNase H111 유전자가 플라스미드에 포함되어 있음을 발견하고, 이를 pBCA3P88로 명명하였다.

### (3) RNase H111 유전자를 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열 확인

참고 실시예 3-(2)에서 수득된 플라스미드 pBCA3P88내로 삽입된 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 디데옥시 방법에 따라 확인하였다.

확인된 뉴클레오티드 서열을 분석하여 RNase H111의 N-말단 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 오픈 리딩 프레임의 존재를 밝혀냈다. 오픈 리딩 프레임의 뉴클레오티드 서열 및 뉴클레오티드 서열로부터 유도된 RNase H111의 아미노산 서열을 각각 서열번호 16 및 17에 나타낸다.

### (4) RNase H111을 발현시키기 위한 플라스미드의 작제

주형으로서 참고 실시예 3-(2)에 기술된 플라스미드 pBCA3P88, RNase H111 및 M13 프라이머(Takara Shuzo)에 대한 상기 언급된 오픈 리딩 프레임 주위의 서열과 관련하여 명명된 서열번호 18의 BcaRN111Nde를 사용하여 100 µl의 용량으로 PCR을 수행하였다. Pyrobest DNA 폴리머라제(Takara Shuzo)를 첨부된 프로토콜에 따라 PCR을 위해 DNA 폴리머라제로서 사용하였다. PCR을 하기과 같이 수행하였다: 30초 동안 94°C, 30초 동안 55°C, 3분 동안 72°C에서 30사이클. 약 4kb의 증폭된 DNA 단편을 Nde1(Takara Shuzo)로 분해하고 아가로스 겔 전기영동시켜 겔로부터 약 1.4kb의 DNA 단편을 회수하였다. Nde1로 분해되고 알칼리성 포스포타제(Takara Shuzo)로 탈인산화된 pTV119Nd(pTV119N중 NcoI 사이트가 NdeI 사이트로 전환된 플라스미드)로 약 1.4kb의 DNA 단편을 결합시켰다. 결합 혼합물을 사용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 형질전환시켰다.

이어서, 주형으로서 플로니중 하나, 및 프라이머로서 RN-N(Takara Shuzo) 및 BcaRN111-3을 사용하여 PCR을 수행하고 Nde1 단편중 RNase H111 유전자가 벡터 pTV119Nd중 lac 프로모터로부터 하류에 연결된 플라스미드를 스크리닝하였다. 이어서 RNase H111 유전자를 포함하는 것으로 가정된 플로니를 선별하였다. TaKaRa-Z Taq(Takara Shuzo)를 첨부된 프로토콜에 따라 PCR을 위해 DNA 폴리머라제로서 사용하였다. PCR을 하기과 같이 수행하였다: 0초 동안 98°C, 0초 동안 55°C, 20초 동안 72°C에서 30사이클. 결과 플로니 2번이 Nde1 단편중 RNase H111 유전자가 벡터 pTV119Nd중 lac 프로모터로부터 하류에 연결된 플라스미드를 포함한다는 것을 발견하였다. 이 플라스미드를 pBCA3Nd2로 명명하였다.

디데옥시 방법에 의해 플라스미드내로 삽입된 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 확인하므로써 개시코돈 6TGA가 ATG로 변환되었다는 것을 제외하고 PCR에 의한 돌연변이는 없음을 밝혀냈다.

플라스미드 pBCA3Nd2로 형질전환된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109/pBCA3Nd2로 명명하고 기탁번호 FERM BP-765381에 2000년 9월 5일(원 기탁일) International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central(6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566)에 기탁하였다.

### (5) 정제된 RNase H111 샘플의 제조

참고 실시예 3-(4)에서 수득된 pBCA3Nd2로 형질전환된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 100 µg/ml의 엡피실린을 포함하는 2L의 LB 배지내로 접종하고 37°C에서 16시간 동안 진탕시키면서 배양하였다. 배양후, 원심분리에 의해 회수한 세포를 39.6ml의 초음파 처리 완충액[50mM Tris-HCl(pH 8.0), 2mM 1mM EDTA, 2mM 페닐메탄설포닐 플루오라이드]에 현탁시키고 초음파처리하였다. 10분 동안 12000rpm에서 초음파 처리된 현탁액을 원심분리하여 수득한 상층액을 15분 동안 60°C에서 가열하였다. 10분 동안 다시 12000rpm에서 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 따라서, 39.6ml의 가열된 상층액을 수득하였다.

가열된 상층액을 완충액 A[50mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA]으로 평형화된 RESOURCE Q 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용하고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 크로마토그래피하였다. 결과, RNase H111은 RESOURCE Q 칼럼을 통해 이동하였다.

45ml의 이동 RNase H111 분획을 2L의 완충액 B[50mM Tris-HCl(pH 7.0), 1mM EDTA]에 대하여 2시간 동안 투석하였다. 동일한 조건하에 2회 더 투석을 반복하였다. 55.8ml의 투석된 효소 용액을 완충액 B로 평형화된 RESOURCE Q 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 0 내지 500mM NaCl의 선형 구배로 용출시켰다. 약 105mM NaCl로 용출된 RNase H111을 포함하는 분획을 수득하였다.

1M NaCl을 포함하는 완충액 B를 7.0ml의 분획에 가하여 NaCl의 농도를 150mM으로 만들었다. 혼합물을 150mM NaCl을 포함하는 완충액 B로 평형화된 HiTrap-heparin 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시켰다. 결과, RNase H111은 RESOURCE Q 칼럼을 통해 이동하였다.

7.8ml의 이동 RNase H111 분획을 한외여과에 의해 Centricon-10(Amicon)을 사용하여 농축시켰다. 190 µl의 농축액을 100mM NaCl 및 0.1mM EDTA를 포함하는 50mM Tris-HCl(pH 7.0)로 평형화된 Superdex 20 겔 여과 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 동일한 완충액으로 용출시켰다. 결과 RNase H111이 분자량 33킬로달톤에 상응하는 위치에서 용출되었다. 이 분자량은 모노머 형태의 RNase H의 것과 일치한다.

수득한 Bca RNase HIII 샘플로서 사용하였다.

그렇게 수득한 Bca RNase HIII 샘플의 효소 활성을 하기와 같이 측정하였다.

40°C에서 인큐베이션된 100  $\mu$ l의 반응 혼합물[20mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 0.001% 소 혈청 알부민 (Takara Shuzo), 1% 디메틸 설퍍시드, 10mM 염화마그네슘, 20  $\mu$ g/ml poly(dT)(Amersham Pharmacia Biotech) 및 30  $\mu$ g/ml poly(rA)(Amersham Pharmacia Biotech)을 Bca RNase HIII 샘플에 가하였다. 혼합물을 10분동안 40°C에서 반응시켰다. 이어서 0.5M EDTA(pH 8.0)를 가하여 반응을 종결시켰다. 260nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 Bca RNase HIII 샘플에 대하여 RNase H 활성을 관찰하였다.

참고 실시예 4: 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) RNase HII 유전자 클로닝

(1) 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*)로부터 게놈 DNA 제조

1% 트립톤(Difco Laboratories), 0.5% 효모 추출물(Difco Laboratories), 1% 가용성 전분 (Nacalai Tesque), 3.5% Jamarine S Solid (Jamarine Laboratory), 0.5% Jamarine S Liquid (Jamarine Laboratory), 0.003% MgSO<sub>4</sub>, 0.001% NaCl, 0.0001% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.0001% CoSO<sub>4</sub>, 0.0001% CaCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.0001% ZnSO<sub>4</sub>, 0.1ppm CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.1ppm KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 0.1ppm H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1ppm Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 및 0.25mM NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 포함하는 2L 배지를 2L 배지용 병에 넣고, 20분동안 120°C에서 멸균하고 질소 가스로 내כל링하여 산소를 제거한 후 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen: DSM3638)을 배지내 접종하고 진탕하지 않고 16시간동안 95°C에서 배양하였다. 배양 후 세포를 원심분리에 의해 회수하였다.

생성된 세포를 4mL의 25% 수크로오스, 및 50mM tris-HCl(pH 8.0)에 현탁시켰다. 물중 0.4mL의 10mg/mL의 리소자임 클로라이드(Nacalai Tesque)를 가하였다. 혼합물을 1시간동안 20°C에서 반응시켰다. 반응 후, 150mM NaCl, 1mM EDTA 및 20mM tris-HCl(pH 8.0), 0.2mL의 20mg/mL 프로테아제 K(Takara Shuzo) 및 2mL을 10% 소듐 라우릴 설퍼이트 수용액을 포함하는 24mL의 혼합물을 반응 혼합물에 가하였다. 혼합물을 1시간동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 후 혼합물을 페놀-클로로포름 추출후 에탄올 침전시켜 1mg의 게놈 DNA를 제조하였다.

(2) RNase HII 유전자 클로닝

피로코쿠스 호리코시미(*Pyrococcus horikoshii*)의 전장 게놈 서열이 공개되었다[DNA Research, 5:55-76 (1998)]. 게놈중 RNase HII(PH1650)의 동족체를 코딩하는 하나의 유전자의 존재가 공지되었다(서열번호:19, the home page of National Institute of Technology 및 Evaluation: <http://www.nite.go.jp/>).

PH1650 유전자 및 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*)의 일부 공개된 게놈 서열 (the home page of University of Utah, Utah Genome Center: <http://www.genome.utah.edu/sequence.html>)의 상동성을 조사하였다. 결과 고도의 상동성 서열을 발견하였다. 프라이머 1650Nde (서열번호:20) 및 1650Bam (서열번호:21)을 상동 서열에 기초하여 합성하였다.

추형으로서 200ng의 참고 실시예 4-(1)에서 제조된 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 게놈 DNA, 및 프라이머로서 20pmol의 1650Nde 및 20pmol 1650Bam을 사용하여 100  $\mu$ l의 용량으로 PCR를 수행하였다. Takara EX Taq(Takara Shuzo)를 첨부된 프로토콜에 따라 PCR를 위해 DNA 폴리머라제로서 사용하였다. PCR를 하기와 같이 수행하였다: 30초동안 94°C, 30초동안 55°C, 1분동안 72°C에서 30사이클, 약 0.7kb의 증폭된 DNA 단편을 NdeI 및 BamHI(Takara Shuzo)로 분해하였다. 생성된 DNA 단편을 플라스미드 벡터 pET3a(Novagen)중 NdeI 및 BamHI 사이트 사이에 삽입하여 플라스미드 pPFU220를 제조하였다.

(3) RNase HII 유전자를 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열의 확인

참고 실시예 4-(2)에서 수득한 pPFU220 내로 삽입된 DNA 단편의 뉴클레오타이드 서열을 디데옥시 방법에 의해 확인하였다.

확인된 뉴클레오타이드 서열을 분석하여 RNase HII를 코딩하는 것으로 가정된 오픈 리딩 프레임의 존재를 밝혀냈다. 오픈 리딩 프레임의 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 22에 나타낸다. 뉴클레오타이드 서열로부터 유도된 RNase H의 아미노산 서열을 서열번호 23에 나타낸다.

플라스미드 pPFU220로 형질전환된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109/pPFU220로 명명하고 2000년 월 5일(원기탁일)에 기탁번호 BP-765481에 International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central(6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, Japan)에 기탁하였다.

(4) 정제된 RNase HII 샘플의 제조

에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HMS174(DE3) (Novagen)을 참고 실시예 4-(2)에서 수득한 pPFU220으로 형질전환시켰다. pPFU220을 포함하는 생성된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HMS174(DE3)를 100  $\mu$ g/mL의 암피실린을 포함하는 2L의 LB 배지내로 접종하고 37°C에서 16시간동안 진탕시키면서 배양하였다. 배양후, 원심분리에 의해 회수한 세포를 66.0mL의 초음파 처리 완충액[50mM tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA, 2mM 페닐메탄설포닐 플루오라이드]에 현탁시키고 초음파처리하였다. 10분동안 12000rpm에서 초음파 처리된 현탁액을 원심분리하여 수득한 상층액을 15분동안 60°C에서 가열하였다. 10분동안 다시 12000rpm에서 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 따라서, 61.5mL의 가열된 상층액을 수득하였다.

가열된 상층액을 완충액 A[50mM tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA]으로 평형화된 RESOURCE Q 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용하고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 크로마토그래피하였다. 결과, RNase H는 RESOURCE Q 칼럼을 통해 이동하였다.

60.0mL의 이동(flow-through) RNase H 분획을 완충액 A으로 평형화된 RESOURCE Q 칼럼(Amersham

Pharmacia Biotech)에 적용시키고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 0 내지 500mM NaCl의 선형 구배로 용출시켰다. 약 150mM NaCl로 용출된 RNase H를 포함하는 분획을 수득하였다. 2.0mL의 RNase H 분획을 100mM NaCl 및 0.1mM EDTA를 포함하는 50mM tris-HCl(pH 8.0)으로 평형화한 Superdex 200 겔 여과 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 동일한 완충액으로 용출시켰다. 결과 RNase H1이 분자량 17킬도달톤에 상응하는 위치에서 용출되었다. 이 분자량은 모노머 형태의 RNase H1의 것과 일치한다.

용리된 RNase H1을 Pfu RNase H1 샘플로서 사용하였다.

수득한 Pfu RNase H1 샘플의 효소 활성을 참고 실시예 3-(5)에 기술된 방법과 같이 측정하였다. 결과, Pfu RNase H1 샘플에 대하여 RNase H 활성을 관찰하였다.

참고 실시예 5: 씨모토가 마리티마 (*Thermotoga maritima*) RNase H1 유전자 클로닝

(1) 씨모토가 마리티마 (*Thermotoga maritima*)로부터 게놈 DNA 제조

1% 트립톤, 0.5% 효모 추출물, 1% 가용성 전분, 3.5% Jamarine S Solid, 0.5% Jamarine S Liquid, 0.003% MgSO<sub>4</sub>, 0.001% NaCl, 0.0001% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.0001% CoSO<sub>4</sub>, 0.0001% CaCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.0001% ZnSO<sub>4</sub>, 0.1ppm CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.1ppm KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0.1ppm H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1ppm Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 및 0.25mM NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 포함하는 2L 배지를 2L 배지용 병에 넣고, 20분동안 120°C에서 멸균하고 질소 가스로 버블링하여 산소를 제거한 후 씨모토가 마리티마 (*Thermotoga maritima*) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen; DSM3109)를 배지내 접종하고 진탕하지 않고 16시간동안 85°C에서 배양하였다.

300mL의 배양액으로부터 원심분리에 의해 회수된 세포를 3mL의 TE 완충액(10mM tris-HCl(pH 7.5), 1mM EDTA)에 현탁시켰다. 150 µL의 10% 소듐 라우릴 설페이트 수용액(Nacalai Tesque) 및 15 µL의 20mg/mL 프로테이나제 K(Takara Shuzo)를 가하였다. 혼합물을 1시간동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 후 0.5mL의 5M NaCl을 혼합물에 가하였다. 완전하게 혼합시킨 후, 0.4mL의 CTAB-NaCl 용액(10% 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(Nacalai Tesque), 0.7M NaCl)를 혼합물에 가하였다. 완전하게 혼합시킨 후, 혼합물을 65°C에서 10분동안 인큐베이션시켰다. 1.5mL의 클로로포름/이소아밀 알코올의 혼합물(24:1, v/v)를 가하였다. 혼합물을 10분동안 서서히 혼합시키고 5분동안 20000 × g에서 원심분리하였다. 원심분리한 후, 용량의 100mM tris-HCl(pH 8.0)으로 포화된 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올의 혼합물(25:24:1, v/v)을 생성된 상층액에 가하였다. 혼합물을 10분동안 서서히 혼합시키고 5분동안 20000 × g에서 원심분리하였다. 원심분리 후 0.6 용량의 2-프로판올을 생성된 상층액에 가하였다. 10000 × g에서 5분간 원심분리하여 수득된 침전물을 70% 에탄올로 세척하고 공기-건조시킨 후 200mL의 TE 완충액에 용해시켜 게놈 DNA 용액을 수득하였다.

(2) RNase H1 유전자 클로닝

씨모토가 마리티마 (*Thermotoga maritima*)의 게놈 DNA의 뉴클레오타이드 서열에서 RNase H1 유전자로서 확인된 부위의 뉴클레오타이드 서열(<http://www.tigr.org/tdb/CMR/btm/htmls/SplashPage.html>)에 기초하여 서열번호 24 내지 27로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 915-F1, 915-F2, 915-R1, 915-R2를 합성하여 주형으로서 씨모토가 마리티마 (*Thermotoga maritima*) 게놈 DNA를 사용하여 PCR을 수행하여 RNase H 유전자를 포함하는 증폭된 DNA 단편을 수득하였다.

주형으로서 참고 실시예 5-(1)에서 제조된 씨모토가 마리티마 (*Thermotoga maritima*) 게놈 DNA, 및 프라이머 쌍으로서 915-F1 및 915-R1, 915-F1 및 915-R2, 915-F2, 915-R1 및 915-F2 및 915-R2를 사용하여 PCR을 수행하였다. Takara EX Taq(Takara Shuzo)를 함유된 프로토콜에 따라 PCR을 위해 DNA 폴리머라제로서 사용하였다. PCR을 하기와 같이 수행하였다: 0.5분동안 95°C, 0.5분동안 55°C, 1.5분동안 72°C에서 25 사이클. 반응 후, 각 PCR 산물을 아가로스 겔 전기영동시켜 추출하고 약 0.7kb의 증폭된 DNA 단편을 정제하였다. 프라이머 쌍 915-F1 및 915-R1, 또는 915-F1 및 915-R2를 사용하여 증폭된 DNA를 HindIII 및 XbaI(Takara Shuzo)로 분해하고 T4 DNA 리가아제를 사용하여 HindIII 및 XbaI로 분해된 pUC19로 결합시켰다. 결합 혼합물을 사용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 형질전환시켰다. 생성된 형질전환체를 배양하여 약 0.7kb DNA가 삽입된 플라스미드 DNA를 제조하였다. 결과, 915-F1 및 915-R1을 사용하여 증폭된 DNA를 갖는 플라스미드 1번 및 2번 및 915-F1 및 915-R2를 사용하여 증폭된 DNA를 갖는 플라스미드 3번 및 4번을 수득하였다.

또한, 프라이머 쌍 915-F2 및 915-R1 또는 915-F2 및 915-R2를 사용하여 증폭된 DNA를 NcoI(Takara Shuzo) 및 XbaI로 이중으로 분해하고 T4 DNA 리가아제를 사용하여 NcoI(Takara Shuzo) 및 XbaI로 이중으로 분해된 pTV119N(Takara Shuzo)로 결합시켰다. 결합 혼합물을 사용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 형질전환시켰다.

생성된 형질전환체를 배양하여 약 0.7kb DNA가 삽입된 플라스미드 DNA를 제조하였다. 결과, 915-F2 및 915-R1을 사용하여 증폭된 DNA를 갖는 플라스미드 5번 및 6번 및 915-F2 및 915-R2를 사용하여 증폭된 DNA를 갖는 플라스미드 7번 및 8번을 수득하였다.

플라스미드 7번으로 형질전환된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109/pTM-RNH로 명명하고, 2000년 월 5일(원기탁일)에 기탁번호 8P-76526하에 International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central(6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8565, Japan)에 기탁하였다.

(3) 씨모토가 마리티마 (*Thermotoga maritima*) RNase H1 유전자 발현

플라스미드 1번 내지 7번 또는 pUC19중 하나로 형질전환된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 100 µg/mL의 앵피실린을 포함하는 5mL의 LB 배지(10g/L 트립톤, 5g/L 효모 추출물, 5g/L NaCl, pH 7.2)내로 접종하고 37°C에서 진탕시키면서 배양하였다. 660nm에서 흡광도가 0.5에 도달하였을 때, 이소프로판올-β-D-티오갈락토피라노시드를 가하여 최종 농도를 1mM으로 하고 세포를 밤새도록 배양하였다. 배양

후, 원심분리에 의해 회수한 세포를 1ml의 TE 완충액에 현탁시키고 초음파처리하였다. 초음파 처리된 현탁액을 10분동안 80°C에서 가열하였다. 원심분리에 의해 수득한 상층액을 세포 원추출물로서 사용하였다. 참고 실시예 2-(5)에 기술된 방법과 같이 세포 원추출물 으로부터 사용하여 흡광도를 측정하였다. 결과, 반응을  $MnCl_2$ 의 존재하에 수행하는 경우 플라스미드 3, 5, 6, 또는 7번을 포함하는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109로부터 제조된 세포 원추출액을 사용하는 각 반응으로부터 얻은 260nm에서의 흡광도는 pUS19를 포함하는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109로부터 제조된 세포 원추출액을 사용하는 각 반응으로부터 얻은 것보다 매우 현저하게 높았다. 따라서, 플라스미드 3, 5, 6, 또는 7번은 RNase H를 포함하고 이를 플라스미드를 포함하는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)가 RNase H 활성을 나타낸다는 것을 입증하였다.

에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)에서 RNase 활성을 나타내는 것을 입증된 플라스미드가 삽입된 DNA 단편의 부분 뉴클레오타이드 서열을 확인하였다. 확인된 뉴클레오타이드 서열을 분석하여 RNase H1을 코딩하는 것으로 가정한 오픈 리딩 프레임의 발현을 밝혔다. 오픈 리딩 프레임의 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 143에 나타낸다. 뉴클레오타이드 서열로부터 유도된 RNase H1의 아미노산 서열을 서열번호 144에 나타낸다. 이어서 PCR시 생성될 수 있는 한개의 염기 치환하여 코딩되는 아미노산 잔기를 변화시키는 것을 플라스미드 7번에 삽입된 DNA 단편의 부분 뉴클레오타이드 서열의 부위에서 관찰하였다.

#### (4) 정제된 RNase H1 샘플 제조

참고 실시예 5-(2)에서 수득한 pTM-RNH로 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 형질전환시켰다. pTM-RNH를 포함하는 생성된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 100 µg/ml의 암피실린을 포함하는 1L의 LB 배지내로 접종하고 37°C에서 16시간동안 진탕시키면서 배양하였다. 배양후, 원심분리에 의해 회수한 세포를 31.0ml의 초음파 처리 완충액[50mM tris-HCl(pH 8.0), 2mM 2-머캅토에탄올, 10% 글리세롤, 2mM 페닐메탄설포닐 플루오라이드]에 현탁시키고 초음파처리하였다. 10분동안 12000rpm에서 초음파 처리된 현탁액을 원심분리하여 수득한 상층액을 15분동안 70°C에서 가열하였다. 10분동안 다시 12000rpm에서 다시 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 따라서, 32.0ml의 가열된 상층액을 수득하였다.

가열된 상층액을 완충액 C[50mM tris-HCl(pH 8.0), 2mM 2-머캅토에탄올, 10% 글리세롤]으로 평형화된 RESOURCE Q 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용하고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 크로마토그래피하였다. 결과, RNase H는 RESOURCE Q 칼럼을 통해 이동하였다. 32.5ml의 이동(flow-through) RNase H 분획을 완충액 C로 평형화된 RESOURCE Q 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 0 내지 500mM NaCl의 선형 구배로 용출시켰다. 약 240mM NaCl로 용출된 RNase H를 포함하는 분획을 수득하였다. 2.0ml의 RNase H 분획을 50mM NaCl을 포함하는 완충액 C: PD-10 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시켰다. 3.5ml의 생성된 용출액을 50 mM NaCl을 완충액 C로 평형화된 Histrap-heparin 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 FPLC 시스템을 사용하여 0 내지 550mM NaCl의 선형 구배로 용출시켰다. 결과 약 295mM NaCl로 용출된 RNase H를 포함하는 분획을 수득하였다. 용출된 RNase H를 Tma RNase H1 샘플로 사용하였다.

RNase H1을 Tma RNase H1 샘플의 효소 활성을 참고 실시예 2-(6)에 기술된 바와 같이 측정하였다. 결과 RNase H 활성이 RNase H1을 Tma RNase H1 샘플에 대하여 관찰되었다.

#### 참고 실시예 6: 피로코쿠스 호리코시미(*Pyrococcus horikoshii*) RNase H1 유전자 클로닝

##### (1) 피로코쿠스 호리코시미(*Pyrococcus horikoshii*)로부터 게놈 DNA 제조

1% 트립톤(Difco Laboratories), 0.5% 효모 추출물(Difco Laboratories), 1% 가용성 전분 (Nacalai Tesque), 3.5% Jamarine S Solid (Jamarine Laboratory), 0.5% Jamarine S Liquid (Jamarine Laboratory), 0.003%  $MgSO_4$ , 0.001% NaCl, 0.0001%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.0001%  $CoSO_4$ , 0.0001%  $CaCl_2 \cdot 7H_2O$ , 0.0001%  $ZnSO_4$ , 0.1ppm  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.1ppm  $KAl(SO_4)_2$ , 0.1ppm  $H_2BO_3$ , 0.1ppm  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 및 0.25mM  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 포함하는 2L 배지를 2L 배지용 병에 넣고, 20분동안 120°C에서 멸균하고 질소 가스로 버블링하여 산소를 제거한 후 피로코쿠스 호리코시미(*Pyrococcus horikoshii*) OT3(Institute of Physical and Chemical Research(RIKEN); JCM9974)를 배지내 접종하고 진탕하지 않고 16시간동안 95°C에서 배양하였다. 배양 후 세포를 원심분리에 의해 회수하였다.

세포를 4ml의 25% 수크로오스, 50mM tris-HCl(pH 8.0)에 현탁시켰다. 용중 0.4ml의 10mg/ml 리조자임 클로라이드(Nacalai Tesque)를 가하였다. 혼합물을 20°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 150mM NaCl, 1mM EDTA 및 20mM tris-HCl(pH 8.0), 0.2ml의 20mg/ml의 프로테나제 K(Takara Shuzo) 및 2ml의 10% 소듐라우릴 설페이트 수용액을 포함하는 24ml의 혼합물을 반응 혼합물에 가하였다. 혼합물을 1시간동안 37°C에서 인큐베이션시켰다.

반응 후, 혼합물을 페놀-추출 후 에탄올 침전시켜 약 1mg의 게놈 DNA를 제조하였다.

##### (2) RNase H1 유전자 클로닝

피로코쿠스 호리코시미(*Pyrococcus horikoshii*)의 전장 게놈 서열이 공개되어 있다(DNA Research, 5:55-76 (1998)). RNase H1 (PH1650) 동족체를 코딩하는 하나의 유전자의 존재가 공지되어 있다(서열번호:145, the home page of National Institute of Technology 및 Evaluation: <http://www.nite.go.jp/>).

프라이머 PhoNde (서열번호:146) 및 PhoBam (서열번호:147)를 PH1650 유전자 (서열번호:145) 서열에 기초하여 합성하였다.

주형으로서 참고 실시예 6-(1)에서 제조된 피로코쿠스 호리코시미(*Pyrococcus horikoshii*) 게놈 DNA 100ng, 및 프라이머로서 각각 20pmol의 PhoNde 및 PhoBam를 사용하여 100 µl의 용량으로 수행하였다. Takara EX Taq(Takara Shuzo)를 첨가된 프로토콜에 따라 PCR를 위해 DNA 폴리머라제로서 사용하였다. PCR을 하기와 같이 수행하였다: 30초동안 94°C, 30초동안 55°C, 1분동안 72°C에서 40사이클, 약 0.7kb의 증폭된 DNA 단편을 NdeI 및 BamHI(Takara Shuzo)로 분해하였다. 이어서 플라스미드 pPH0238를 플라스미드

벡터 pET3a(Novagen)중 NdeI 및 BamHI사이의 생성된 DNA 단편에 삽입하여 작제하였다.

### (3) RNase HII 유전자를 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열의 확인

참고 실시예 6-(2)에서 수득한 pPH0238 내로 삽입된 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 디데옥시 방법에 의해 확인하였다.

확인된 뉴클레오티드 서열을 분석하여 RNase HII를 코딩하는 것으로 가정된 오픈 리딩 프레임의 존재를 밝혀냈다. 오픈 리딩 프레임의 뉴클레오티드 서열을 서열번호 148에 나타낸다. 뉴클레오티드 서열로부터 유도된 RNase HII의 아미노산 서열을 서열번호 149에 나타낸다.

플라스미드 pPH0238로 형질전환된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109/pPH0238로 명명하고 2000년 월 5일(원기탁일)에 기탁번호 BP-76928하에 International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central(6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, Japan)에 기탁하였다.

### (4) 정제된 RNase HII 샘플 제조

참고 실시예 6-(2)에서 수득한 pPH0238로 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HMS174(DE3)(Novagen)를 형질전환시켰다. pPH0238를 포함하는 생성된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) HMS174(DE3)를 100 µg/ml의 엡실린을 포함하는 1L의 LB 배지내로 접종하고 37°C에서 16시간동안 진탕시키면서 배양하였다. 배양 후, 원심분리에 의해 회수한 세포를 34.3ml의 초음파 처리 완충액[50mM tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA, 2mM 페닐메탄설폰 플루오라이드]에 현탁시키고 초음파처리하였다. 10분동안 12000rpm에서 초음파 처리된 현탁액을 원심분리하여 수득한 상층액을 15분동안 70°C에서 가열하였다. 10분동안 다시 12000rpm에서 다시 원심분리하여 수득한 상층액을 15분동안 80°C에서 가열하였다. 이어서 다시 10분동안 12000rpm에서 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 따라서, 33.5ml의 가열된 상층액을 수득하였다.

가열된 상층액을 완충액 A[50mM tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA]으로 평형화된 RESOURCE Q 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용하고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 크로마토그래피하였다. 결과, RNase H는 RESOURCE Q 칼럼을 통해 이동하였다.

35.0ml의 이동(flow-through) RNase H 분획을 2L의 완충액 B[50mM tris-HCl(pH 7.0), 1mM EDTA]를 2시간 동안 투석하였다. 투석을 2회 더 반복하였다. 34.5ml의 투석 효소 용액을 완충액 B로 으로 평형화된 RESOURCE Q 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 0 내지 500mM NaCl의 선형 구배로 용출시켰다. 약 155mM NaCl로 용출된 RNase H를 포함하는 분획을 수득하였다.

완충액 B를 4.0ml의 분획에 가하여 최종 농도를 50mM으로 하였다. 혼합물을 50mM NaCl을 포함하는 완충액 B로 평형화된 HTrap-heparin 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 50 내지 550mM NaCl의 선형 구배로 용출시켰다. 약 160mM NaCl로 용출된 RNase H를 포함하는 분획을 수득하였다.

6.9ml의 RNase HII 분획을 한외여과에 의해 Centricon-10(Amicon)을 사용하여 농축시켰다. 250 µl의 농축액으로 각각 분리된 2분량을 100mM NaCl 및 0.1mM EDTA를 포함하는 50mM Tris-HCl(pH 7.0)로 평형화된 Superose 6 겔 여과 칼럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 동일한 완충액으로 용출시켰다. 결과 RNase HII가 분자량 24.5 킬로달톤에 상응하는 위치에서 용출되었다. 이 분자량은 모노머 형태의 RNase H의 것과 일치한다.

수득한 Pho RNase HII 샘플로서 사용하였다.

그렇게 수득한 Pho RNase HII 샘플의 효소 활성을 참고 실시예 3-(5)에 기술된 바와 같이 측정하였다. 결과 Pho RNase HII 샘플에 대하여 RNase H 활성을 관찰하였다.

### 참고 실시예 7: 마키오글로부스 풀기두스(*Aerhaeoglobus fulgidus*)로부터 RNase HII 유전자 클로닝

8ml의 배양액으로부터 회수된 마키오글로부스 풀기두스(*Aerhaeoglobus fulgidus*)(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen로부터 구입; DSM4139)를 100 µl의 25% 수크로스, 50mM tris-HCl(pH 8.0)에 현탁시켰다. 최종 20ml의 0.5M EDTA 및 10ml의 10mg/ml 리조자임 클로라이드(Nacalai Tesque)를 가하였다. 혼합물을 20°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후, 150mM NaCl, 1mM EDTA 및 20mM tris-HCl(pH 8.0), 10 µl의 20mg/ml의 프로테나제 K(Takara Shuzo) 및 50 µl의 10% 소듐 라우릴 설페이트 수용액을 포함하는 800 µl의 혼합물을 반응 혼합물에 가하였다. 혼합물을 1시간동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 후, 혼합물을 페놀-추출 후 에탄올 침전시키고 공기 건조시킨 후 50 µl의 TE에 용해시켜 게놈 DNA 용액을 제조하였다.

### (2) RNase HII 유전자 클로닝

마키오글로부스 풀기두스(*Aerhaeoglobus fulgidus*)의 전장 게놈 서열이 공개되어 있다[Nature, 390: 364-370(1997)]. RNase HII (AF0621) 통족체를 코딩하는 하나의 유전자의 존재가 공지되어 있다(서열번호: 150, (<http://www.tigr.org/tdb/CMR/btm/htmls/SplashPage.html>)).

프라이머 AfuNde(서열번호: 151) 및 AfuBam(서열번호 152)를 Af0621 유전자(서열번호 150)에 기초하여 합성하였다.

주형으로서 참고 실시예 7-(1)에서 제조된 마키오글로부스 풀기두스(*Aerhaeoglobus fulgidus*) 게놈 DNA 30ng, 및 프라이머로서 각각 20pmol의 AfuNde 및 AfuBam을 사용하여 100 µl의 용량으로 수행하였다. Pyrobest DNA 폴리머라제(Takara Shuzo)를 첨부된 프로토콜에 따라 PCR를 위해 DNA 폴리머라제로서 사용하였다. PCR를 하기와 같이 수행하였다: 30초동안 94°C, 30초동안 55°C, 1분동안 72°C에서 40사이클, 약 0.6kb의 증폭된 DNA 단편을 NdeI 및 BamHI(Takara Shuzo)로 분해하였다. 이어서 플라스미드 pAFU204를 플

라스미드 벡터 pTV119Nd중 NdeI 및 BamHI사이의 생성된 DNA 단편에 삽입하여 작제하였다(pTV119중 NcoI가 NdeI 사이트로 전환된 플라스미드).

### (3) RNase HII 유전자를 포함하는 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열의 확인

참고 실시예 7-(2)에서 수득한 pAFU204 내로 삽입된 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 디데옥시 방법에 의해 확인하였다.

확인된 뉴클레오티드 서열을 분석하여 RNase HII를 코딩하는 것으로 가정된 오픈 리딩 프레임의 존재를 밝혔다. 오픈 리딩 프레임의 뉴클레오티드 서열을 서열번호 153에 나타낸다. 뉴클레오티드 서열로부터 유도된 RNase HII의 아미노산 서열을 서열번호 154에 나타낸다.

플라스미드 pAFU204로 형질전환된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109/pAFU204로 명명하고 2001년 2월 22일(원기탁일)에 기탁번호 BP-769261에 International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central(6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, Japan)에 기탁하였다.

### (4) 정제된 RNase HII 샘플 제조

참고 실시예 7-(2)에서 수득한 pAFU204로 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)를 형질전환시켰다. pAFU204를 포함하는 생성된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 100 µg/ml의 앰피실린을 포함하는 2L의 LB 배지내로 접종하고 37°C에서 16시간동안 진탕시키면서 배양하였다. 배양후, 원심분리에 의해 회수한 세포를 37.1ml의 초음파 처리 완충액(50mM tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA, 2mM 페닐메탄설포닐 플루오라이드)에 현탁시키고 초음파처리하였다. 10분동안 12000rpm에서 초음파 처리된 현탁액을 원심분리하여 수득한 상층액을 15분동안 70°C에서 가열하였다. 10분동안 다시 12000rpm에서 다시 원심분리하여 수득한 상층액을 15분동안 80°C에서 가열하였다.

가열된 상층액을 완충액 A[50mM tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA]으로 평형화된 RESOURCE Q 랫럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용하고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 크로마토그래피하였다. 결과, RNase H는 RESOURCE Q 랫럼을 통해 이동하였다.

35.0ml의 이동(flow-through) RNase HII 분획을 완충액 A으로 평형화된 RESOURCE S 랫럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용하고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 크로마토그래피하였다. 결과, RNase H는 RESOURCE S 랫럼을 통해 이동하였다.

40.0ml의 이동 RNase HII 분획을 50mM NaCl을 포함하는 2L의 완충액 B[50mM tris-HCl(pH 7.0), 1mM EDTA]를 2시간동안 투석하였다. 투석을 2회 더 반복하였다. 40.2ml의 투석 효소 용액을 50mM NaCl을 포함하는 완충액 B로 평형화된 HiTrap-heparin 랫럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 FPLC 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 0 내지 500mM NaCl의 선형 구배로 용출시켰다. 약 240mM NaCl로 용출된 RNase HII를 포함하는 분획을 수득하였다.

7.8ml의 RNase HII 분획을 한외막과에 의해 Centricon-10(Amicon)을 사용하여 농축시켰다. 600 µl의 농축액으로 각각 분리된 4분량을 100mM NaCl 및 0.1mM EDTA를 포함하는 50mM Tris-HCl(pH 7.0)로 평형화된 Superose 6 겔 여과 랫럼(Amersham Pharmacia Biotech)에 적용시키고 동일한 완충액으로 용출시켰다. 결과 RNase HII가 분자량 30.0 킬로달톤에 상응하는 위치에서 용출되었다. 이 분자량은 모노머 형태의 RNase HII의 것과 일치한다.

상기 기술된 바와 같이 용출된 RNase HII를 Afu RNase HII 샘플로서 사용하였다.

수득한 Afu RNase HII 샘플의 효소 활성을 참고 실시예 3-(5)에 기술된 바와 같이 측정하였다. 결과 Afu RNase HII 샘플에 대한 RNase H 활성을 관찰하였다.

### 참고 실시예 8

본 발명에서 사용되는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H의 유닛 값을 하기 방법에 따라 측정하였다.

#### (1) 사용하는 시약 용액의 제조

역가측정용 반응 혼합물 : 최종농도가 각각 40mM 트리스-염산(pH 7.7, 37°C), 4mM 염화마그네슘, 1mM DTT, 0.003% BSA, 4% 글리세롤 및 24 µM 폴리(dT)가 되도록 멸균수로 제조하였다.

폴리(8-<sup>3</sup>H)아데닐산 용액 : 370kBq의 폴리(8-<sup>3</sup>H)아데닐산 용액을 200 µl의 멸균수에 희석하였다.

폴리아데닐산 용액 : 폴리아데닐산을 초순수의 멸균수(sterile ultra pure water)를 사용하여 3mM의 농도로 희석시켰다.

효소 희석액 : 최종농도가 각각 25mM 트리스-염산(pH 7.5, 37°C), 5mM 2-머캅토에탄올, 0.5mM EDTA(pH 7.5, 37°C), 30mM 염화나트륨 및 50% 글리세롤이 되도록 멸균수로 제조하였다.

열변성 송아지 흉선 DNA의 제조 : 송아지 흉선 DNA 200mg을 TE 완충액 100ml에 현탁하여 평온시켰다. 이 용액을 UV 260nm에서 측정된 흡광도에 기초하여 1mg/ml의 농도가 되도록 멸균 초순수로 희석하였다. 이어서, 이 용액을 100°C에서 10분간 가열한 후, 얼음조에서 급냉하였다.

#### (2) 활성 측정 방법

상기 (1)에서 제조한 역가측정용 반응 혼합물 985 µl에 폴리(8-<sup>3</sup>H)아데닐산 용액 7 µl를 가하였다. 상기 혼합물을 37°C에서 10분간 인큐베이션시켰다. 최종농도가 24 µM이 되도록 8 µl의 폴리아데닐산을 가하였다.



추가로 37°C에서 5분간 인큐베이션시켰다. 이렇게 하여 폴리(8-<sup>3</sup>H) rA-폴리dT 반응 혼합물 1000 $\mu$ l를 제조하였다. 이어서, 이 반응액 200 $\mu$ l를 30°C에서 5분간 인큐베이션시켰다. 적절하게 희석된 일련의 효소액 1 $\mu$ l를 가하였다. 시간동안 이를 반응액을 50 $\mu$ l씩 샘플링하여, 다음 측정에 사용하였다. 효소첨가로부터 샘플링까지의 시간을 Y분으로 하였다. 또, 총 CPM용 반응 혼합물 50 $\mu$ l 또는 블랭크용 반응 혼합물 50 $\mu$ l를 효소액 대신에 효소 희석액을 1 $\mu$ l 가하여 제조하였다. 이 샘플링 용액에 10mM 피클린산 나트륨 100 $\mu$ l, 열변성 용매지 혼성 DNA 용액 50 $\mu$ l 및 10% 트리클로로 아세트산 300 $\mu$ l(총 CPM 측정의 경우는, 초순수 300 $\mu$ l)를 가하였다. 혼합물을 0°C에서 5분간 인큐베이션시킨 후, 10000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 수득된 상등액 250 $\mu$ l를 바이알에 넣었다. 마쿠아플-2(NEN Life Science Products) 10ml를 가하였다. 액체 신타레이션 카운터(Scintillation counter)로 CPM을 측정하였다.

### (3) 유닛 계산

각 효소의 유닛 값을 이하의 계산식으로 산출하였다.

$$\text{유닛스/ml} = \{(\text{측정된 CPM}-\text{블랭크 CPM}) \times 1.2' \times 20 \times 1000 \times \text{희석율}\} / \{(\text{총 CPM} \times Y(\text{분}) \times 50(\mu\text{l}) \times 9''\}$$

1.2' : 50 $\mu$ l당 총 CPM중에 함유된 폴리(8-<sup>3</sup>H) rA-폴리dT의 양(nmol)

9'' : 보정계수

### 실시예 1

본 발명의 방법은 장출혈성 E.coli 0-157를 검출하기 위하여 사용되었다.

실시예에서 사용되는 프라이머의 서열을 서열 목록의 서열번호 31 내지 34에 나타낸다. 프라이머 각각 서열번호 31 또는 32의 서열을 갖는 프라이머의 결합물을 0-157의 베토크소(VT) 1을 코딩하는 서열을 검출하기 위하여 작제하고, 프라이머 각각 서열번호 33 또는 34의 서열을 갖는 프라이머의 결합물을 0-157의 베토크소(VT) 2를 코딩하는 서열을 검출하기 위하여 작제하였다. 장출혈성 E.coli 0-157(ATCC 수탁번호 43895)를 배양하고, 세포를 회수하고, 적절한 세포 밀도로 멸균수에서 세포를 현탁시키고 10분동안 98°C에서 처리하여 제조된 온수 추출액을 주형으로서 사용하였다. 반응 혼합물의 조성은 하기와 같았다.

27mM 인산 완충액(pH 7.3), 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 5% 디메틸설폭사이드(DMSO), 1mM 각 dNTPs, 8mM 마세트산마그네슘, 60pmol의 각각의 프라이머, 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup>개의 세포에 상응하는 주형으로서 DNA(온수-추출액) 및 48  $\mu$ l의 반응 용량으로 멸균 증류수. 반응 혼합물을 1분동안 98°C에서 열-변성시킨 후 55°C으로 냉각시켰다. 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 60U E.coli RNase H를 가하였다. 반응 혼합물을 60분동안 55°C에서 인큐베이션시켰다. 이후, 혼합물을 2분동안 90°C에서 가열하여 효소를 불활성화시켰다. 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 4% NuSieve 3:1 아가로스(Takara Shuzo) 겔상에서 전기영동시켰다. 결과, 베토크소 1 및 2가 프라이머 쌍중 하나 및 10<sup>4</sup>개 세포에 상응하는 주형으로서 DNA를 사용하여 검출될 수 있고, 본 발명의 방법이 특정 박테리움을 검출하기 위한 방법으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

### 실시예 2

(1) 본 발명의 방법에서 사용되는 완충액 유형의 효능을 조사하였다. 서열번호 39 및 40에 나타낸 서열을 갖는  $\lambda$  DNA를 증폭시키는 프라이머를 실시예에서 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 120pmol의 각 프라이머, 0.01% 프로필렌디아민 수용액 및 주형으로서 10ng 또는 1ng DNA를 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시키고, 열을상에서 냉각시켜 프라이머가 주형 DNA에 어닐링되도록 하였다. 서열번호 41 및 42에 나타낸 프라이머 및 주형으로서  $\lambda$  DNA(Takara Shuzo)를 사용하여 PCR에 의하고, Suprec02(Takara Shuzo)를 사용하여 정제된 증폭 산물(1005bp)을 주형으로서 사용하였다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 5.0mM 아세트산마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 11U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H를 포함하는 40  $\mu$ l의 3가지 유형의 반응 용 완충액(42.5mM Tricine-수산화칼륨(pH 8.5), 42.5mM Bicine-수산화칼륨(pH 8.5) 및 42.5mM HEPES-수산화칼륨(pH 8.5))중 하나를 혼합물에 가하여 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 이후, 관심의 대상이 되는 증폭 단편을 주형의 양으로 물디에 대하여 관찰하였다. 특히 더 많은 증폭 산물을 Bicine-수산화칼륨(pH 8.5)을 포함하는 반응 시스템에서 수득하였다.

(2) HEPES-수산화칼륨 완충액의 사용에 대한 반응 개선을 조사하였다. 멀티-클로닝 사이트내로 삽입된 약 150bp의 DNA 단편을 갖는 pUC19 플라스미드를 주형으로서 사용하였다. 주형을 하기와 같이 제조하였다.

서열번호 134 및 135로 나타낸 서열을 갖는 pUC19 상류(upper) 150' PCR 프라이머 및 pUC19 하류(lower) PCR 프라이머 및 주형으로서 100pg의 pUC19 플라스미드 DNA를 사용하여 PCR을 수행하였다. 생성된 증폭 단편을 Microcon-100을 사용하여 정제하고, DNA 불연결 키트(Takara Shuzo)를 사용하여 말단을 둔화시키고 플라스미드 pUC19의 HindIII 사이트내로 서브클로닝하였다. 삽입된 증폭 단편을 갖는 플라스미드를 사용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) JM109를 형질전환시켰다. 형질전환체를 배양하였다. 삽입된 DNA를 갖는 플라스미드를 QIAGEN 플라스미드 미니 키트(Qiagen)를 사용하여 세포로부터 정제하고 주형으로서 사용하였다.

상기 기재된 바와 같이 제조된 pUC19-150 플라스미드 DNA, 및 서열번호 35 및 36에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 MCS-F 및 MCS-R를 사용하여 PCR-증폭된 DNA 단편을 주형으로서 사용하였다. 서열번호 37 및 38로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 MF2N3(24) 및 MR1N3(24)를 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머로서 사용하였다. 이들 프라이머 결합물을 사용하여 수득된 증폭 단편의 크기는 약 350 bp이었다.

HEPES-수산화칼륨 완충 시스템을 조사하고자 하는 완충액으로서 사용하였다. 인산칼륨 완충 시스템 및 Tricine 완충 시스템을 대조군으로서 사용하였다. 반응 혼합물의 조성은 하기와 같다.

반응 혼합물 A: 10  $\mu$ l의 반응 용량으로 10ng의 PCR-증폭된 단편, 50 pmol의 각각의 프라이머 MF2N3(24) 및 MR1N3(24), 0.01% 프로필렌디아민 수용액 및 10 M 아세트산마그네슘 및 멸균종류수.

반응 혼합물 B: 하기의 3가지 유형을 제조하였다.

수산화칼륨 완충 시스템 : 최종 농도로 35mM 수산화칼륨 완충액(pH 7.5), 1.25% DMSO, 1.25% BSA, 5mM 아세트산마그네슘, 0.625mM 각 dNTPs, 50U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 5.5U E.coli RNase H를 포함하는 40  $\mu$ l의 반응 혼합물을 제조하였다.

Tricine 완충 시스템 : 최종 농도로 42.5mM Tricine 완충액(pH 7.5), 12.5mM 염화칼륨, 12.5mM 황산암모늄, 1.25% DMSO, 1.25% BSA, 5mM 아세트산마그네슘, 0.625mM 각 dNTPs, 30U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 5.5U E.coli RNase H를 포함하는 40  $\mu$ l의 반응 혼합물을 제조하였다.

HEPES-수산화칼륨 완충 시스템 : 최종 농도로 25mM HEPES-수산화칼륨 완충액(pH 7.8), 125mM 아세트산칼륨, 12.5mM 황산암모늄, 1.25% DMSO, 1.25% BSA, 5mM 아세트산마그네슘, 0.625mM 각 dNTPs, 30U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 5.5U E.coli RNase H를 포함하는 40  $\mu$ l의 반응 혼합물을 제조하였다.

반응 혼합물 A를 2분동안 98°C에서 열-변성시키고, 60°C 또는 65°C로 냉각시킨 후 얼음상에서 방치시켰다. 반응 혼합물 B중 하나를 얼음상에서 반응 혼합물 A에 가하여 50  $\mu$ l로 반응 용량을 만들었다. 반응 혼합물을 1시간동안 60°C 또는 65°C로 인큐베이션시켰다. 반응 후, 4°C로 냉각시키고 1/10 용량의 0.5M EDTA를 각 혼합물에 가하여 반응을 종결시켰다. 3  $\mu$ l의 각 혼합물을 3% NuSieve 3:1 아가로스 (Takara Shuzo) 겔상에서 전기영동시켰다. 결과, 관심의 대상이 되는 증폭된 단편은 사용된 반응 온도에서 상전이가 3개의 완충 시스템을 관찰하였다. 특히 다량의 증폭 산물 및 높은 반응성을 본 실시예에서 HEPES-수산화칼륨에 대하여 관찰하였다.

### 실시예 3

(1) 프라이머를 주형에 어닐링하기 위한 본 발명의 방법에서 사용되는 조건을 조사하였다. WO 97/32010에 기술된 플라보박테리움 속(*Flavobacterium*) SA-0082 (수탁번호 FERM P-148728)에 1995년 3월 29일 기탁 International Patent organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, 및 수탁번호 FERM BP-54028에 International Patent 또는 organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, Japan에 기탁 (국제 기탁 기관으로서의 이관일: 1996년 2월 15일)의 부분 뉴클레오타이드 서열에 기초한 서열번호 43 및 44에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 사용하였다. 주형으로서 플라보박테리움 속(*Flavobacterium*) SA-0082로부터의 게놈 DNA 및 서열번호 45 및 46에 나타난 프라이머의 결합물을 사용한 PCR에 의해 수득된 증폭 산물(573 bp)을 Suprec02 (Takara Shuzo)를 사용하여 정제 한 후 본 실시예에서 주형으로서의 DNA로 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 2  $\mu$ l의 두개의 어닐링 용액중 하나(500mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘, 또는 0.05% 프로필렌디아민)를 120pmol의 각 프라이머에 가하였다. 10ng 또는 1ng의 PCR-증폭 단편을 추가로 포함하는 최종 용량 10  $\mu$ l의 각 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시켰다. 변성 후, 혼합물을 신속하게 얼음상에서 냉각시켜 프라이머를 주형에 어닐링시켰다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 5.0mM 아세트산마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 11U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H를 포함하는 40  $\mu$ l의 3가지 유형의 반응을 완충액(42.5mM Tricine-수산화칼륨(pH 8.5), 42.5mM Bicine-수산화칼륨(pH 8.5) 및 42.5mM HEPES-수산화칼륨(pH 8.5)중 하나를 혼합물에 가하여 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 52°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과물 도 1에 나타낸다. 도 1은 어닐링 용액 및 완충액의 각 결합물을 사용한 반응물의 전기영동의 결과를 나타낸다. 레인 1: 분자량 마커(100bp 레더, Takara Shuzo); 레인 2: 프로필렌디아민/Tricine(주형: 10ng); 레인 3: 프로필렌디아민/HEPES(주형: 10ng); 레인 4: 프로필렌디아민/HEPES(주형: 1ng); 레인 5: 프로필렌디아민/Bicine(주형: 10ng); 레인 6: 프로필렌디아민/Bicine (주형: 1 ng); 레인 7: 500 mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘/Bicine(주형: 10ng); 레인 8: 500 mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘/Bicine(주형: 1ng); 레인 9: 분자량 마커(100bp 레더); 레인 10: 프로필렌디아민/Tricine(주형: 1ng); 레인 11: 500 mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘/Tricine(주형: 1ng); 레인 12: 프로필렌디아민/HEPES(주형: 1ng); 레인 13: 500 mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘/HEPES(주형: 1ng); 레인 14: 프로필렌디아민/Bicine (주형: 1 ng); 레인 15: 500 mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘/Bicine(주형: 1ng).

도 1에 나타난 바와 같이 주형으로서 DNA의 양에 상관없이 주형 DNA에 프라이머를 어닐링하기 위하여 500 mM 염화칼륨 + 8  $\mu$ M 스퍼미딘을 포함하는 어닐링 용액을 사용하는 경우 더 많은 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 수득하였다. 특히 500 mM 염화칼륨 + 8  $\mu$ M 스퍼미딘을 포함하는 어닐링 용액 및 Bicine-염화칼륨 완충액의 배합물을 본 실시예에서 우수한 결과를 산출한다.

(2)  $\lambda$  DNA로부터의 PCR-증폭 단편을 주형으로서 사용하는 경우 어닐링 용액의 효능을 조사하였다. 실시예 2(1)에 기술된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 본 실시예에서 사용하였다. 실시예 2(1)에서 제조된 바와 같은 PCR-증폭 단편 또는  $\lambda$  DNA를 주형 DNA로 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 2  $\mu$ l의 3가지 형태의 어닐링 용액중 하나(500mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘, 또는 멸균수)를 120pmol의 각 프라이머에 가하였다. 10ng 또는 1ng의 PCR-증폭 단편을 추가로 포함하는 10  $\mu$ l의 각 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시키고, 신속하게 얼음상에서 냉각시켜 프라이머를 주형에 어닐링시켰다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 5.0mM 아세트산마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 11U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H를 포함하는 40  $\mu$ l의 3가지 유형의 반응

용 완충액(42.5mM Tricine-수산화칼륨(pH 8.5), 42.5mM Bicine-수산화칼륨(pH 8.5) 및 42.5mM HEPES-수산화칼륨(pH 8.5))중 하나를 혼합물에 가하여 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 52  $^{\circ}$ C에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 2에 나타낸다. 도 2는 주형의 양, 반응 완충액 및 어닐링 용액의 조합을 조합한 결과를 나타내는 전기영동 결과를 설명한다. 레인 1: 분자량 마커(100bp 레더); 레인 2: 10ng 주형, Tricine/500mM 염화칼륨 및 스퍼미딘 배합물; 레인 3: 1ng 주형, Tricine/500mM 염화칼륨 및 스퍼미딘 배합물; 레인 4: 10ng 주형, Bicine/500mM 염화칼륨 및 스퍼미딘 배합물; 레인 5: 1ng 주형, Bicine/500mM 염화칼륨 및 스퍼미딘 배합물; 레인 6: 10ng 주형, HEPES/500mM 염화칼륨 및 스퍼미딘 배합물; 레인 7: 1ng 주형, HEPES/500mM 염화칼륨 및 스퍼미딘 배합물; 레인 8: 분자량 마커(100bp 레더); 레인 9: 10 ng의 주형, Tricine/프로필렌디아민 배합물; 레인 10: 1 ng의 주형, Tricine/프로필렌디아민 배합물; 레인 11: 10 ng의 주형, Bicine/프로필렌디아민 배합물; 레인 12: 1 ng의 주형, Bicine/프로필렌디아민 배합물; 레인 13: 10 ng의 주형, HEPES/프로필렌디아민 배합물; 레인 14: 10 ng의 주형, HEPES/프로필렌디아민 배합물; 레인 15: 분자량 마커(100bp 레더); 레인 16: 10 ng의 주형, Tricine/를 배합물; 레인 17: 1 ng의 주형, Tricine/를 배합물; 레인 18: 10 ng의 주형, Bicine/를 배합물; 레인 19: 1 ng의 주형, Bicine/를 배합물; 레인 20: 10 ng의 주형, HEPES/를 배합물; 레인 21: 10 ng의 주형, HEPES/를 배합물.

도 2에 나타낸 바와 같이 관심의 대상이 되는 증폭 단편을 주형 DNA의 양과 상관없이 3개의 완충액의 각 배합물에 대하여 관찰하였다. 특히 500mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘을 포함하는 어닐링 용액 및 Bicine 완충액의 배합물을 사용하여 더 많은 증폭된 단편을 수득하였다.

#### 실시예 4

본 발명의 방법에서 역전사 효소(RNase)의 저해제의 존재에 대한 효능을 조사하였다. 포스포노포름산(PFA)를 RTase의 저해제로서 사용하였다. 서열번호 47 및 48에 나타낸 프라이머를 본 실시예에서 사용하였다. 주형으로서 장출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157로부터 유래된 게놈 DNA 및 서열번호 49 및 50에 나타낸 프라이머를 사용하여 PCR, 이어서 Suprec02 (Takara Shuzo)에 의해 정제시킴으로써 얻은 에 의해 수득한 증폭 산물(576bp)을 주형 DNA로 사용하였다. 반응을 하기과 같이 수행하였다. 간단하게, 1ng의 PCR-증폭 단편을 120pmol의 각 프라이머 및 500mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘을 포함하는 2  $\mu$ l의 어닐링 용액에 가하여 제조된 10  $\mu$ l의 각 혼합물을 2분동안 98  $^{\circ}$ C에서 열-변성시키고, 신속하게 얼음상에서 냉각시켜 프라이머를 주형에 어닐링시켰다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 42.5mM Tricine-수산화칼륨 완충액(pH 8.5), 5.0mM 마그네슘아세테이트, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 11U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H 및 500  $\mu$ g/ml 또는 50  $\mu$ g/ml의 농도로 PFA를 포함하는 40  $\mu$ l의 혼합물을 어닐링 혼합물에 가하여 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 55  $^{\circ}$ C에서 인큐베이션시켰다. PFA를 첨가하지 않는 시스템을 대조군으로 사용하였다. 반응후, 9  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 3에 나타낸다. 도 3은 역전사 효소 활성의 저해제 효능을 설명하는 전기영동 결과를 나타낸다. 레인 1: 분자량 마커(100bp 레더); 레인 2: PFA 첨가하지 않음; 레인 3: 500  $\mu$ g/ml의 PFA 첨가; 레인 4: 50  $\mu$ g/ml의 PFA 첨가.

도 3에 나타낸 바와 같이, PFA를 첨가하였을 때 비특정 증폭은 억제되었고 관심의 대상이 되는 단편이 관찰되었다. 특히 PFA를 첨가하지 않은 시스템에서 관찰된 비특정 증폭 산물은 관찰되지 않았고 관심의 대상이 되는 증폭 단편은 PFA를 50  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가한 시스템에서 명확하게 증폭되었음을 확인하였다.

#### 실시예 5

본 발명의 방법에서 증폭시키고자 하는 단편의 길이 및 검출 감수성의 관계를 조사하였다.

(1) 서열번호 51 내지 52에 나타낸 장출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157 벡로독소를 증폭시키기 위한 프라이머를 합성하였다. 실시예 4에서 사용된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하였다. 각각의 프라이머 결합물을 사용하는 증폭시키고자 하는 단편의 길이는 하기와 같았다. 247 bp (서열번호 51 및 48); 168 bp (서열번호 52 및 53); 206 bp (서열번호 52 및 48); 135 bp (서열번호 47 및 53); 및 173 bp (서열번호 47 및 48). 실시예 4에서 제조된 정제된 PCR-증폭 576bp 단편을 본 실시예에서 주형으로서 사용하였다. 반응을 하기과 같이 수행하였다. 간단하게, 60pmol의 각 프라이머, 2  $\mu$ l의 0.05% 폴리에틸렌아민 수용액 및 10fg 내지 10ng의 PCT-증폭 단편을 포함하는 10  $\mu$ l의 각 혼합물을 2분동안 98  $^{\circ}$ C에서 열-변성시킨 후, Thermal Cycler Persnal(Takara Shuzo)내에서 55  $^{\circ}$ C으로 냉각시켜 프라이머를 주형에 어닐링시켰다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 42.5mM Tricine-수산화칼륨 완충액(pH 8.5), 5.0mM 마그네슘아세테이트, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H 및 100  $\mu$ g/ml 또는 10  $\mu$ g/ml의 농도로 PFA를 포함하는 40  $\mu$ l의 혼합물을 가하여 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1 시간동안 55  $^{\circ}$ C에서 인큐베이션시켰다. 반응 후 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 대조군으로서 10fg 내지 10ng의 PCR-증폭 단편의 검출을 서열번호 54 및 55로 나타낸 프라이머를 사용하여 수행하였다. 135-bp의 단편을 이들 프라이머의 결합물을 사용하여 증폭시킨다. 60pmol의 각 프라이머, 5  $\mu$ l의 10 x Ex Taq 완충액(Takara Shuzo), 1.25U TaKaRa Ex Taq DNA 폴리머라제(Takara Shuzo) 및 0.2mM의 각 dNTPs를 포함하는 50  $\mu$ l의 PCR 용액을 제조하였다. PCR을 하기과 같이 수행하였다: 30초동안 94  $^{\circ}$ C, 30초동안 55  $^{\circ}$ C, 30초동안 72  $^{\circ}$ C에서 25 또는 30사이클(2분, 38초/사이클). 반응후, 1  $\mu$ l(ICAN) 또는 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 4 및 표 1에 나타낸다.

표 1

증폭 크기(bp)	검출 한도
ICAN(총 시간: 70분)	
247	100pg
168	100fg
206	100pg
135	10fg
173	100fg
PCR(25사이클: 총시간:약 66분)	
135	100fg
PCR(30사이클: 총시간:약 80분)	
135	19fg

도 4는 ICAN(1/50의 반응 혼합물을 로딩) 및 PCR(1/10의 반응 혼합물을 로딩)에 의해 수득한 새 길이 135bp를 증폭시키기 위한 검출 한도를 나타내는 전기영동의 결과를 보여준다. 레인 1: 분자량 마커(100bp 레더); 레인 2: 1ng의 주형을 사용한 ICAN; 레인 3: 100fg의 주형을 사용한 ICAN; 레인 4: 10fg의 주형을 사용한 ICAN; 레인 5: 1ng의 주형을 사용한 PCR(25사이클); 레인 6: 100fg의 주형을 사용한 PCR(25사이클); 레인 7: 10fg의 주형을 사용한 PCR(25사이클); 레인 8: 1pg의 주형을 사용한 PCR(30사이클); 레인 9: 100fg의 주형을 사용한 PCR(30사이클); 레인 10: 10fg의 주형을 사용한 PCR(30사이클).

표 1에 나타난 바와 같이, PCR의 것과 동일한 검출 감수성을 ICAN에서 수득하였음을 확인하였다. 또한, PCR에 대한 총 반응 시간은 약 80분이고, 본 발명의 방법을 사용하여 동일한 검출 감수성을 얻기 위하여 필요한 반응 시간은 70분이고, 이는 반응 시간은 본 발명의 방법을 사용하여 단축될 수 있음을 확인시켜 주었다.

(2) 서열번호 39, 40 및 56에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖는  $\lambda$  DNA를 증폭시키기 위한 프라이머를 합성하였다. 각 프라이머 결합물을 사용하여 증폭시키고자 하는 단편의 길이는 하기와 같다: 151 bp (서열번호 39 및 40) 및 125 bp (서열번호 56 및 40). 실시예 2(1)에서 제조된 주형 DNA를 본 실시예에서 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 2  $\mu$ l의 머닐링 용액(500mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘), 1fg 내지 1ng의 주형을 120pmol의 각 프라이머에 가하고 멸균수로 10  $\mu$ l까지 채웠다. 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시킨 후, 얼음상에서 신속하게 냉각시켜 프라이머를 주형에 머닐링시켰다.

머닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 42.5mM Tricine-수산화칼륨 완충액(pH 8.5), 5.0mM 마그네슘아세테이트, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 11U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H 및 멸균수를 포함하는 40  $\mu$ l의 혼합물을 가하여 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1 시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 후 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 표 2에 나타낸다.

표 2

증폭 크기(bp)	검출 한도
125	10fg
151	100fg

표 2에 나타난 바와 같이,  $\lambda$  DNA를 주형으로서 사용하는 경우 10fg와 같은 낮은 검출 감수성을 최적 부위를 조사하여 얻었다.

(3) 증폭 단편(길이: 340 bp)을 플라스미드 T7Blue T-벡터 (Takara Shuzo)로 삽입하여 플라스미드를 제조하였다. 서열번호 57 및 58을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 크리스산썬(ohrysanthum) 비로이드 유전자를 증폭시키기 위한 합성 프라이머 및 주형으로서 비로이드로 감염된 크리스산썬(ohrysanthum)로부터의 RNA를 사용하여 단편을 JP-A 9-140383 에 기재된 바와 같이 제조하였다. 플라스미드를 사용하여 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli) JM109 항체 반응 능력이 있는 세포(Takara Shuzo)를 형질전환시켰다. 형질전환체를 16시간동안 37°C에서 5ml의 LB에서 배양하였다. 플라스미드를 매뉴얼에 따라 QIAGEN 플라스미드 미니 키트(QIAGEN)를 사용하여 최후한 세포로부터 정제하였다. 1  $\mu$ l의 멸균수중 0fg, 1fg, 10fg, 100fg, 1pg, 10pg, 100pg, 또는 1ng의 플라스미드를 Beckman UC-600(Beckman)을 사용하여 측정된 바와 같은 플라스미드의 농도에 기초하여 제조하였다. 1  $\mu$ l의 제조된 플라스미드 용액중 하나를 50  $\mu$ l의 각 ICAN 반응 시스템을 위한 주형으로서 사용하였다. 서열번호 59 및 60 프라이머 CSVD-F2 및 CSVD-R6를 본 실시예에서 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 50pmol의 각 프라이머, 1  $\mu$ l의 제조된 플라스미드 용액 및 최종 농도 0.01%의 프로필렌디아민을 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시킨 후, Thermal Cycler Personal(Takara Shuzo)에서 1분간 상기 온도에서 인큐베이션시키고 얼음상에 방치하였다.

머닐링 후, 최종 농도로 20mM HEPES-염화칼륨(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 1% DMSO, 0.01% BSA, 4mM 아세트산마그네슘, 500  $\mu$ M의 각 dNTPs, 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H를 혼합물에 가

하여 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 60 $^{\circ}$ C로 세팅된 Thermal Cycler Personal(Takara Shuzo)에 넣고 60분동안 반응시켰다. 반응 후 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3% NuSieve 3:1 아가로스 겔상에 전기영동시켰다. 결과 관심의 대상이 되는 증폭 산물(약 90bp, 약 70bp 및 약 50bp)를 10fg의 농도로 주형을 사용하여 관찰되었다.

#### 실시예 6

본 발명의 방법에서 사용되는 프라이머를 조사하였다.

(1) 프라이머의  $T_m$  값 및 반응 온도를 조사하였다. 서열번호43 및 61-63에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖는 플라보박테리움(*Flavobacterium*) 종, SA-0082를 증폭시키기 위한 프라이머를 합성하였다. 이 프라이머를 삭제하여 약 20%의 GC 함량을 갖는 160bp 이하의 부위를 증폭시켰다. 각 프라이머 결합물을 사용하여 증폭시키고자 하는 단편의 길이는 하기와 같았다: 126 bp (서열번호43 및 62); 158 bp (서열번호43 및 63); 91 bp (서열번호61 및 62); 및 123 bp (서열번호61 및 63). 실시예3(1)에서 제조된 PCR-증폭 산물을 본 실시예에서 주형 DNA로서 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 20pmol의 각 프라이머, 2  $\mu$ l의 3가지 유형중 어닐링 용액(500mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘, 0.05% 포르필렌디아민, 또는 물) 하나, 1fg 내지 10ng의 주형을 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 2분동안 98 $^{\circ}$ C에서 열-변성시킨 후, 얼음상에서 신속하게 냉각시켜 프라이머를 주형에 어닐링시켰다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 5.0mM 아세트산마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭시드(DMSO), 11U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H를 포함하는 40  $\mu$ l의 3가지 유형의 반응 용액(17mM Tricine-수산화칼륨(pH 8.5), 17mM Bicine-수산화칼륨(pH 8.5) 및 17mM HEPES-수산화칼륨(pH 8.5)중 하나를 혼합물에 가하여 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 52, 55 또는 60 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에 전기영동시켰다. 결과, 관심의 대상이 되는 증폭 단편을 52 $^{\circ}$ C의 반응 온도를 사용하여 관찰하였다. 특히, 500mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘 및 Tricine 또는 Bicine 완충액을 포함하는 어닐링 용액의 결합물을 사용하여 더 많은 양의 관심의 대상이 되는 증폭 단편을 수득하였다. 프라이머 쌍, 증폭 단편의 길이 및 52 $^{\circ}$ C의 반응 온도에 대한 검출 감수성을 도 5 및 표 3에 나타낸다.

표 3

증폭 크기(bp)	검출 한도
126	100fg
158	1pg
91	1fg
123	100fg

도 5는 AT-풍부한 부위를 증폭시킬 때 주형 DNA의 양과 증폭된 단편의 길이 사이의 관계를 나타내는 전기영동 결과를 보여준다. 레인 1: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 2: 1pg의 주형을 사용하여 길이 91 bp의 단편 증폭; 레인 3: 100 fg의 주형을 사용하여 길이 91 bp의 단편 증폭; 레인 4: 10 fg의 주형을 사용하여 길이 91 bp의 단편 증폭; 레인 5: 1 fg의 주형을 사용하여 길이 91 bp의 단편 증폭; 레인 6: 1 pg의 주형을 사용하여 길이 123bp의 단편 증폭; 레인 7: 100 fg의 주형을 사용하여 길이 123bp의 단편 증폭; 레인 8: 10 fg의 주형을 사용하여 길이 123bp의 단편 증폭; 레인 9: 1 pg의 주형을 사용하여 길이 126bp의 단편 증폭; 레인 10: 100 fg의 주형을 사용하여 길이 126bp의 단편 증폭; 레인 11: 10 fg의 주형을 사용하여 길이 126bp의 단편 증폭; 레인 12: 1 pg의 주형을 사용하여 길이 158bp의 단편 증폭; 레인 13: 100 fg의 주형을 사용하여 길이 158bp의 단편 증폭; 및 레인 14: 10 fg의 주형을 사용하여 길이 158bp의 단편 증폭.

도 5 및 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법을 At-풍부한 주형 및 At-풍부 프라이머 세트를 사용하여 수행하는 경우 프라이머의  $T_m$ 값에 따라 우수한 결과가 더욱 낮은 온도에서 얻을 수 있다는 것인 입증되었다.

(2) 프라이머의 고차 구조(higher-order)가 본 발명의 방법에 영향을 줄 수 있다. 이어서, 프라이머의 고차 구조 형성을 피하고 프라이머를 목적 주형에 용이하게 어닐링시키기 위한 프라이머의 변형을 조사하였다. 서열번호47, 48 및 64-69에 나타난 프라이머를 사용하였다. 특히 서열번호 47에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머, 3'-말단으로부터 4, 5, 또는 6번째 염기에서 이노신 데옥시뉴클레오타이드를 갖는 서열번호64 내지 66의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 12014, 12115 및 12216, 서열번호 104에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머, 및 서열번호67 내지 69에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖고 3'-말단으로부터 4,5,또는 6번째에서 이노신 데옥시뉴클레오타이드를 갖는 프라이머 12314, 12415 및 12516를 사용하였다. 주형으로서 DNA를 실시예 4(1)에서 제조된 것을 본 실시예에서 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다: 간단하게, 50pmol의 각 프라이머, 2  $\mu$ l의 0.05%의 포르필렌디아민 수용액, 1ng 내지 10ng의 주형 DNA 및 평균 종류수를 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 2분동안 98 $^{\circ}$ C에서 열-변성시킨 후, Thermal cycler(GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems)를 사용하여 1분동안 온도에서 인큐베이션시켰다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 42.5mM Tricine-수산화칼륨 완충액(pH 8.5), 5.0mM 아세트산마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭시드(DMSO), 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H 또는 5U의 써머스 썬모필루스(*Thermus thermophilus*) (Tth) (Toyobo, 이하 Tth RNase H로 언급함)로부터의 열-내성 RNase H를 혼합물에 가하여 평균수로 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 55 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 6에 나타낸다.

도 6은 E.coli RNase H 및 Tth RNase H를 사용하였을 때 이노신 데옥시뉴클레오타이드를 포함하는 키메라성

올리고뉴클레오타이드 프라이머의 효능을 보여주는 전기영동의 결과를 설명한다. 레인 2 내지 9는 E.coli RNase H를 사용하여 수득한 결과를 나타낸다. 레인 10 내지 17은 Tth RNase H를 사용한 결과를 보여준다. 레인 1: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 2: 서열번호 47 및 48로 나타낸 프라이머 쌍, 1ng의 주형; 레인 3: 프라이머 12014 및 12314의 쌍, 1ng의 주형; 레인 4: 프라이머 12115 및 12415의 쌍, 1ng의 주형; 레인 5: 프라이머 12216 및 12516의 쌍, 1ng의 주형; 레인 6: 서열번호 47 및 48로 나타낸 프라이머의 쌍, 10ng의 주형; 레인 7: 프라이머 12014 및 12314의 쌍, 10ng의 주형; 레인 8: 프라이머 12115 및 12415의 쌍, 10ng의 주형; 레인 9: 프라이머 12216 및 12516의 쌍, 1ng의 주형; 레인 10: 서열번호 47 및 48로 나타낸 프라이머의 쌍, 1ng의 주형; 레인 11: 프라이머 12014 및 12314의 쌍, 1ng의 주형; 레인 12: 프라이머 12115 및 12415의 쌍, 1ng의 주형; 레인 13: 프라이머 12216 및 12516의 쌍, 1ng의 주형; 레인 14: 서열번호 47 및 48로 나타낸 프라이머의 쌍, 10ng의 주형; 레인 15: 프라이머 12014 및 12314의 쌍, 10ng의 주형; 레인 16: 프라이머 12115 및 12415의 쌍, 10ng의 주형; 및 레인 17: 프라이머 12216 및 12516의 쌍, 10ng의 주형.

도 6에 나타난 바와 같이, 프라이머의 3'-말단으로부터 4 또는 5번째 염기에 삽입된 이노신을 갖는 프라이머를 사용하는 경우 주형의 양에 상관없이 E.coli RNase H 또는 Tth RNase H를 사용하였을 때 관심의 대상이 되는 증폭 산물이 관찰되었다. 이 결과는 ICAN의 반응성은 적절한 위치에 이노신을 삽입함으로써 개선된다는 것을 입증한다.

(3) 상기 (2)에서와 동일한 목적으로 프라이머를 연구하였다. 3'-말단에 3개의 염기가  $\alpha$ -S(또는 알파-티오) 리보뉴클레오타이드인, 즉 RNA 부위에 5'-포스포티오에이트 결합을 갖는 서열번호 84 및 85로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머 1S 및 4S를 합성하였다. 또한, 3'-말단으로부터 3개의 염기 및 대역시리보뉴클레오타이드 부위의 서열중, 한 부위의 리보뉴클레오타이드, 즉 프라이머의 3'-말단으로부터 11 내지 13번째 리보뉴클레오타이드를 갖는 서열번호 70 및 71로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머 1N3N3 및 4N3N3를 합성하였다. 실시예 4에서 제조된 주형 DNA를 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 50pmol의 각 프라이머, 2  $\mu$ l의 0.05%의 프로판렌디아민 수용액, 10ng의 주형 DNA 및 멸균 증류수를 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 2분동안 98°C에서 Thermal cycler를 사용하여 가열한 후 냉각시키기 위하여 얼음상에 방치하였다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 42.5mM Tricine-수산화칼륨 완충액(pH 8.5), 5.0mM 아세트 산마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H 또는 50U의 Tth RNase H를 혼합물에 가하여 멸균수로 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 Thermal cycler에서 1시간동안 55°C에서 인큐베이션시켰다.

반응후, 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과 증폭 산물을 사용된 RNase H의 유형과 상관없이 프라이머 1S 및 4S 또는 1N3N3 및 4N3N3의 결합물을 사용하여 예상 위치에서 증폭 산물을 명확하게 관찰하였다. 이 결과는 5'-포스포티오에이트로 프라이머의 3'-말단에서 프라이머를 변형하는 것이 본 발명의 방법에 효과적이라는 것을 입증하였다. 또한, 프라이머의 3'-말단외에 적절한 내부 위치에서 리보뉴클레오타이드를 사용한 치환이 본 발명의 방법의 반응성을 개선시키는데 효과적임이 확인되었다.

#### 실시예 7

본 발명의 방법에서 특정 망간 이온의 존재하에 E.coli RNase H 활성을 갖는 DNA 폴리머라제의 사용을 조사하였다. 120pmol의 각 실시예 2(1)에서 사용된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 2  $\mu$ l의 500mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스페르미딘을 포함하는 어닐링 용액, 실시예 2(1)에서 사용된 1ng의 주형 DNA 및 멸균 증류수를 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시킨 후 얼음상에 신속하게 냉각시켜 프라이머를 주형에 어닐링시켰다. 어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 42.5mM Tricine-수산화칼륨 완충액(pH 8.5), 5.0mM 아세트 산마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.0% DMSO 및 11U BcaBEST DNA 폴리머라제, 및 최종 농도 0.5, 2.5, 5.0 또는 10mM의 염화마그네슘(Nacal Tesque)을 포함하는 40  $\mu$ l의 혼합물에 멸균수로 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 또한, 염화마그네슘을 첨가하지 않은 혼합물, 및 30U의 E.coli RNase H를 가하고 염화마그네슘을 첨가하지 않은 혼합물을 대조군으로서 제조하였다. 반응후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 7에 나타낸다.

도 7은 BcaBEST DNA 폴리머라제의 RNase H 활성을 사용한 ICAN의 결과를 보여주는 전기영동 결과를 보여준다. 레인 1: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 2: 염화마그네슘 첨가하지 않음/E. coli RNase H 첨가; 레인 3: 염화마그네슘 첨가하지 않음/E. coli RNase H 첨가하지 않음; 레인 4: 0.5 mM 염화마그네슘 첨가/E. coli RNase H 첨가하지 않음; 레인 5: 2.5 mM 염화마그네슘 첨가/E. coli RNase H 첨가하지 않음; 레인 6: 5.0 mM 염화마그네슘 첨가/E. coli RNase H 첨가하지 않음; 및 레인 7: 10.0 mM 염화마그네슘 첨가/E. coli RNase H 첨가하지 않음.

도 7에 나타난 바와 같이 E. coli RNase H의 부재하에 2.5mM 농도의 염화마그네슘을 가한 반응 시스템에서 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 관찰하였다.

#### 실시예 8

본 발명의 방법을 실제 생물학적 샘플을 사용하여 연구하였다.

(1) 주형으로서 장출혈성 에스케리키아 콜리(Escherichia coli) 0-157(ATCC 수탁번호 43895) 배양액으로부터 제조된 온수-추출액을 사용하여 검출을 수행하였다. 장출혈성 E. coli, 0-157(ATCC 수탁번호 43895)을 18시간동안 42°C에서 노보바이오산을 포함하는 mEC 배지에서 배양한 후, 10분동안 95°C에서 가열하였다. 0, 1, 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> 또는 10<sup>5</sup>개의 세포에 상응하는 0-157 온수 추출액은 추출액을 멸균수로 희석하여 제조되었다. 실시예 5(1)에서와 동일한 조건하에서 이들 0-157 온수 추출액중 하나를 사용하여 베토평소 2(VT2) 유전자를 증폭시켰다. 대조군으로서 실시예 5(1)에서와 동일한 조건하에 동일한 주형을 사용하여 PCR을 수행하였다. 반응 후, 1  $\mu$ l(ICAN) 또는 5  $\mu$ l(PCR)의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔

상에서 전기영동시켰다. 결과를 표 4 및 도 8에 나타낸다.

표 4

증폭 크기(bp)	검출한도(세포수)
ICAN(총 시간: 70분)	
135	$10^2$
173	$10^3$
PCR(25사이클; 총 시간: 약 66분)	
135	$10^3$
PCR(30사이클; 총 시간: 약 80분)	
135	$10^2$

도 8은 ICAN 또는 PCR을 사용한 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157의 검출을 나타낸 전기영동 결과를 나타낸다. 증폭된 DNA 길이는 135 bp였다. 레인 1: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 2:  $10^4$ 개 세포에 대한 ICAN; 레인 3:  $10^3$ 개 세포에 대한 ICAN; 레인 4:  $10^2$ 개 세포에 대한 ICAN; 레인 5:  $10^1$ 개 세포에 대한 25사이클의 PCR; 레인 6:  $10^3$ 개 세포에 대한 25사이클의 PCR; 레인 7:  $10^2$ 개 세포에 대한 25사이클의 PCR; 레인 8:  $10^1$ 개 세포에 대한 30사이클의 PCR; 레인 9:  $10^3$ 개 세포에 대한 30사이클의 PCR; 및 레인 10:  $10^2$ 개 세포에 대한 30사이클의 PCR.

표 4 및 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명의 검출 방법의 검출 감수성은 PCR의 것과 동일하였고, 본 발명의 방법의 검출을 위해 필요한 시간은 PCR을 위해 필요한 것과 비교하여 짧은 것을 확인하였다.

(2)  $\lambda$  DNA를 실시예 2 및 4에서 사용한 서열번호 40 및 56으로 나타낸 프라이머를 사용하여 검출하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 120pmol의 각 프라이머, 2  $\mu$ l의 500mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘을 포함하는 어닐링 용액, 10fg 내지 1ng의  $\lambda$  DNA(Takara Shuzo) 및 열균수를 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시킨 후, 얼음상에서 신속하게 냉각시켜 프라이머를 주형에 어닐링시켰다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 42.5mM Tricine-수산화칼륨(pH 8.5), 5.0mM 아세트산마그네슘, 0.0125% 소혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 11U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H를 포함하는 40  $\mu$ l의 혼합물을 혼합물에 가하여 열균수로 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 3  $\mu$ l의 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 표 5에 나타낸다.

표 5

증폭 크기(bp)	검출 한도
125	1pg

도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법이  $\lambda$  DNA 검출에 효과적임을 확인하였다.

(3) 실시예 6(1)에서 사용된 서열번호 61 및 62에 나타낸 프라이머 및 주형으로서 플라보박테리움(*Flavobacterium*) 종, SA-0082으로부터의 게놈 DNA를 사용하여 검출을 수행하였다. 주형으로서 게놈 DNA를 W97/32010에 기입된 바와 같이 배양된 플라보박테리움(*Flavobacterium*) 속의 박테리움으로부터 통상의 방법에 따라 제조하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 120pmol의 각 프라이머, 2  $\mu$ l의 500mM 염화칼륨 및 8  $\mu$ M 스퍼미딘을 포함하는 어닐링 용액, 10fg 내지 1ng의 게놈 DNA 및 열균수를 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시킨 후, 얼음상에서 신속하게 냉각시켜 프라이머를 주형에 어닐링시켰다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 42.5mM Tricine-수산화칼륨(pH 8.5), 5.0mM 아세트산마그네슘, 0.0125% 소혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 11U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H를 포함하는 40  $\mu$ l의 혼합물을 혼합물에 가하여 열균수로 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 52°C에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 3  $\mu$ l의 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 표 6 및 도 9에 나타낸다.

표 6

증폭 크기(bp)	검출 한도
91	100fg

도 9는 플라보박테리움(*Flavobacterium*) 속의 박테리움의 검출을 보여주는 전기영동 결과를 보여준다. 레인 1: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 2: 1ng의 주형; 레인 3: 10pg의 주형; 레인 4: 1pg의 주형; 레인 5: 100fg의 주형; 및 레인 6: 10fg의 주형.

표 6 및 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법은 박테리움 검출에 효과적임을 확인하였다.

#### 실시예 9

본 발명의 증폭 방법 및 하이브리드화 방법을 조합된 표적 핵산 검출 방법을 연구하였다. 장출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157를 주형으로서 선택하였다. 주형 DNA를 실시예 8(1)과 같이 제조하였다. 약 40%의 GC 함량을 갖는 약 100bp의 부위를 증폭시키고자 하는 단편으로서 선택하였다. 서열 번호 51 및 72로 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 VT2-IF20 및 VT2-IV20-2를 프라이머로서 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 50pmol의 프라이머 VT2-IF20 및 VT2-IV20-2, 최종 농도 0.01%의 프로판렌디아민을 포함하는 버퍼링 용액, 0 내지 10<sup>7</sup>개의 세포에 상응하는 온수-추출액 및 멸균수를 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시킨 후, Thermal Cycler Personal(Takara Shuzo)에서 1분동안 상기 온도에서 인큐베이션시키고 버퍼링을 위해 얼음상에 방치하였다.

버퍼링 후, 최종 농도 20mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 100mM 마세트산칼륨, 0.01% 소 펩팅 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭사이드(DMSO); 500  $\mu$ M 각 dNTPs, 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H를 혼합물에 가하여 멸균수로 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 55°C으로 세팅된 Thermal Cycler Personal상에 방치하고 60분동안 상기 온도에서 인큐베이션시켰다. 대조군으로서 Thermal Cycler Personal을 사용하여 매뉴얼에 따라 0-157 Typing Set(Takara Shuzo)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR을 하기과 같이 수행하였다: 1분동안 94°C, 1분동안 55°C, 1분동안 72°C에서 35사이클, 상기 반응은 1 사이클당 약 4분 및 약 145분의 총 시간을 필요로 하였다. 증폭 산물의 예상된 크기는 404bp였다. 반응후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% NuSieve 3:1 마가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 겔과를 도 28A에 나타낸다. 도 28A는 ICAN 또는 PCR을 사용한 장출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157 벡로독소 II의 유전자의 검출에 대한 전기영동 결과를 보여준다. 레인 M1: 분자량 마커(50-2000 bp); 레인 M2: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 N: 음성 대조군; 레인 1: 1개의 세포에 상응하는 주형; 레인 2: 10개의 세포에 상응하는 주형; 레인 3: 10<sup>2</sup>개의 세포에 상응하는 주형; 레인 4: 10<sup>3</sup>개의 세포에 상응하는 주형; 및 레인 5: 10<sup>4</sup>개의 세포에 상응하는 주형. 또한, 1개의 세포 또는 10개의 세포에 대하여 ICAN PCR에 의해 취득한 증폭 수준 결과를 비교한 결과를 표 7에 나타낸다.

표 7

E.Coli 0-157 세포			
	0	1	10
ICAN	-	+	+++
PCR	-	+	+++

: 증폭되지 않음; + 내지 +++는 3단계의 증폭 정도를 나타낸다.

도 28A 및 표 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 검출 방법 및 PCR에 따라 1개의 세포에 상응하는 온수-추출액을 사용하여 반응 시스템에서 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 관찰하였다. 프로브로서 5'-말단에 바 이오틴으로 표지된 서열번호 73으로 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 VT2를 사용하여 ICAN에 따라 취득된 증폭 산물에 대하여 도트 블랏 하이브리드화를 수행하였다. 하이브리드화를 하기 와 같이 수행하였다. 간단하게, 1  $\mu$ l의 반응 혼합물을 5분동안 98°C에서 변성시키고 얼음상에서 신속하게 냉각시키고 Hybond-N<sup>+</sup>(Amersham Pharmacia Biotech)상에 점적하였다. UV에 노출시킨 후, 막을 하이브리드 화 액에 놓았다. 0.5M 디소듐 하이드로게노포스페이트(pH 7.2), 1mM 에틸렌디아민테트라아세트산 및 7% 소듐 라우릴 설페이트를 포함하는 10ml의 하이브리드화 용액을 가하였다. 예비-하이브리드화를 30분동안 42°C에서 수행하였다. 100ng/  $\mu$ l의 농도로 VT2 프로브 용액 10  $\mu$ l을 열-변성시키고 예비-하이브리드화 반응 시스템에 가하였다. 60분동안 42°C에서 하이브리드화한 후 막을 66.6mM 염화나트륨, 66.6mM 시트르산 나트륨 및 0.1% 소듐 라우릴 설페이트를 포함하는 용액중에 실온에서 5분동안 2회 세척하고, 2  $\mu$ l의 5mg/ml의 호스래디쉬 퍼옥시다제 스트렙토마빈 쿼주게이트(PIERCE)가 첨가된 6ml의 세척 완충액(0.3M 염화 나트륨, 17.3mM 디소듐 하이드로게노포스페이트 디하이드레이트, 2.5mM EDTA, 0.1% 소듐 라우릴 설페이트)중에서 42°C에서 12분동안 인큐베이션시킨 후, 실온에서 세척 완충액중 2회 세척하였다. 이어서 막을 실온에서 10ml의 0.1M 시트레이트 완충액(pH 5.0)을 세척한 후 약 10분동안 암실에서 에탄올중 2mg/ml의 테트라메틸벤지딘(TMB, Nacalai Tesque) 용액 250  $\mu$ l, 5  $\mu$ l의 3% 하이드로젠 퍼옥사이드, 5ml의 0.1M 시트레이트 완충액의 혼합물중에서 반응을 시켰다. 발색 후, 탈염수로 반응을 종결시켰다. 결과를 도 28B에 나타낸다. 도 28B는 ICAN에 의해 장출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157로부터 벡로독소 II의 유전자를 검출하기 위한 도트 블랏 하이브리드화 결과를 보여준다. 결과는 상기 언급한 전기영동에서 관찰된 것과 일치하였다. 따라서, 본 발명의 방법의 검출 감수성은 PCR의 것과 일치하였다. 본 발명의 ICAN을 사용하여 증폭 반응을 위해 요구되는 시간은 PCR을 위해 요구되는 것과 비교하여 1/2 이하였다. 따라서, 본 발명의 ICAN이 병원체 등을 검출하기 위해 유효하다는 것이 입증되었다.

#### 실시예 10

(1) 주형으로서 배양 세포로부터의 RNA를 사용하여 역전사-반응 및 본 발명의 방법의 조합을 조사하였다.



반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게,  $1.5 \times 10^5$  세포/ml의 농도로 10% 우태아 혈청(Gibco)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's 배지 (Bio Whittaker, 12-604F)중에 RAW264.7 세포 (ATCC TIB 71)를 현탁시켰다. 5ml의 현탁액을 6-웰 마이크로티터 플레이트의 각 웰에 가하고 5% CO<sub>2</sub> 존재하에 밤새도록 37°C에서 인큐베이션시켰다. 물중 5 µg/ml의 리보플라비나이드(LPS, Sigma) 용액 50 µl 및 물중 1000U/µl의 인터페론-γ (INF-γ, Genzyme Techno) 용액 50 µl를 웰에 가하였다. 플레이트를 추가의 4시간동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 키트에 첨부된 안내서에 따라 RNeasy Mini Kit(Qiagen)을 사용하여 세포로부터 RNA를 제조하였다. 음성 대조군으로서, LPS 또는 INF-γ를 가하지 않은 그룹을 사용하였다.

3 µg의 제조된 RNA, 10mM 트리스-하이드로클로라이드 완충액(pH 8.3), 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM 각 dNTPs, 150pmol의 무작위 6mers 프라이머, 60U의 리보뉴클레아제 저해제(Takara Shuzo) 및 15U의 역전사 효소 XL(AMV)(Takara Shuzo, 2620A)을 포함하는 60 µl의 혼합물을 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 이어서 99°C에서 5분동안 인큐베이션하여 thermal cycler(GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems)을 사용하여 효소를 불활성화시켜 cDNA를 제조하였다.

서열번호 74 및 75로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 마우스 유도 NO 산타아제 (iNOS)(GeneBank 수탁번호 NM-010927)의 mRNA의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다. 대조군으로서 서열번호 76 및 77로 나타낸 PCR용 프라이머 또한 합성하였다.

간단하게, 50pmol의 각 프라이머, 0.05%의 농도의 프로필렌디아민 수용액 2 µl, 1 µl의 주형 DNA(50ng의 RNA에 상응) 및 열균수를 포함하는 10 µl의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시킨 후, 55°C으로 냉각시키고 상기 온도에서 1분동안 Thermal Cycler에서 인큐베이션시켜 프라이머가 주형에 어닐링하도록 하였다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 42.5mM Ticine-수산화칼륨(pH 8.5), 5.0mM 아세트산마그네슘, 0.0125% 소혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 11U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 15U E.coli RNase H를 혼합물에 가하여 열균수를 최종 용량을 50 µl로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 55°C에서 Thermal Cycler에서 인큐베이션시켰다. 반응 샘플을 분석시까지 -20°C에서 냉동시켜 저장하였다. 대조군으로서 PCR을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 50pmol의 각 프라이머, 1 µl의 cDNA(50ng의 RNA에 상응), 5 µl의 10 × Ex Taq 완충액(Takara Shuzo), 1.25U의 TaKaRa Ex Taq DNA 폴리머라제(Takara Shuzo) 및 0.2mM 각 dNTPs를 포함하는 50 µl의 반응 혼합물을 Thermal Cycler에서 반응시켰다. 프로그램은 하기와 같았다: 2분동안 94°C에서 1사이클; 30초동안 94°C, 30초동안 55°C 및 30초동안 72°C에서 30사이클; 및 5분동안 72°C에서 1사이클. 반응 샘플을 분석시까지 -20°C에서 냉동시켜 저장하였다. 반응 후, 5 µl의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 10에 나타낸다.

도 10은 RT-ICAN(A) 및 RT-PCR (B)의 비교를 나타낸 전기영동 결과를 설명한다. 레인 1: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 2: 음성 대조군; 및 레인 3: LPS 및 IFN-γ으로 처리된 그룹.

도 10에 나타낸 바와 같이, LPS 및 IFN-γ으로 처리된 세포로부터 제조된 cDNA를 주형으로서 사용하였을 때만 본 발명의 방법 및 PCR 모두에서 증폭 산물이 관찰되었다. 따라서, 본 발명의 방법이 PCR의 것과 비교하여 반응을 위해 필요한 시간이 더욱 짧기 때문에 본 발명의 방법이 역전사 후 DNA 증폭 방법으로서 더욱 효과적이라는 것을 확인하였다.

#### 실시예 11

최적 온도가 37°C인 E. coli RNase H는 본 발명의 증폭 반응시 불활성화될 수 있다. 이어서 증폭 반응시 반응 혼합물에 E. coli RNase H를 첨가하였을 때의 효능을 조사하였다. 콜리플라워모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터 및 EPSPS 유전자가 삽입된 재조합 소마진으로부터 추출된 게놈 DNA로부터 서열번호 78 및 79로 나타낸 프라이머 GMO-PCR-F 및 GMO-PCR-R를 사용하여 PCR에 의해 수득된 증폭된 단편(1071bp)을 주형 DNA로서 사용하였다. 또한, 서열번호 80 내지 83로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 GMO-S1, S2, A1 및 A2를 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다: 간단하게, 50pmol의 각 프라이머, 0.01%의 농도의 프로필렌디아민, 1pg 내지 10ng의 주형 DNA 및 열균수를 포함하는 10 µl의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시킨 후, 어닐링을 위해 55°C으로 냉각시켰다.

어닐링 후, 최종 농도로 500 µM 각 dNTPs, 34mM Ticine-수산화칼륨(pH 8.7), 4.0mM 아세트산마그네슘, 0.01% 소혈청 알부민(BSA), 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H를 혼합물에 가하여 열균수를 최종 용량을 50 µl로 하였다. 반응 혼합물을 25분동안 55°C에서 Thermal Cycler에서 인큐베이션시켰다. 반응 개시 25분 후 30U의 E.coli RNase H를 추가로 가하였다. 혼합물을 30분동안 55°C에서 인큐베이션시켰다. 대조군으로서, 혼합물을 55분동안 55°C에서 인큐베이션시켜 반응을 수행시켰다. 반응 후, 3 µl의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과, 증폭 효능은 프라이머의 결합력, S1/A1, S1/A2, S2/A1, 및 S2/A2에 대한 주형 DNA의 농도와 상관없이 반응시 E.coli RNase H의 첨가에 의해 개선된다는 것을 확인하였다.

#### 실시예 12

본 발명의 방법에서 주형으로서 사용하는 핵산의 증폭 또는 복제 방법 및 본 발명의 방법의 조합을 조사하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 주형으로서 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)에서 복제된 실시예 5(3)에서 제조된 바와 같은 크리산썬비로이드(*chrysanthemum viroid*) 유전자를 포함하는 플라스미드 및 T7 RNA 폴리머라제 (Takara Shuzo)를 사용하여 시험관내 전사를 수행하여 RNA로부터 복제된 단편을 수득하였다. 서열번호 57 및 58에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 cDNA 합성 키트(Takara Shuzo)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 주형으로서 cDNA 단편 또는 복제된 플라스미드를 사용하여 실시예 5(3)에 기술된 바와 같이 증폭 반응을 수행하였다. 결과 플라스미드 형태로 복제된 핵산 및 RNA 폴리머라제를 사용하여 RNA로부터 복제된 cDNA의 형태의 핵산을 본 발명의 방법을 위한 주형

으로서 사용할 수 있다는 것을 확인하였다.

#### 실시예 13

##### (1) 프라이머 합성

서열목록 86 및 87로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 프라이머 NS1 및 NS2를 마우스 유도 NO 신타아제 (iNOS)에 대한 mRNA의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다.

##### (2) 주형으로서 PCR 산물을 사용하는 ICAN에 따른 DNA 단편의 증폭

50pmol의 각 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 2 µl의 0.05%의 프로필렌디아민 수용액 및 10fg 내지 10pg의 주형 DNA를 포함하는 10 µl의 혼합물을 Thermal cycler(GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems)을 사용하여 2분동안 98°C, 2분동안 60°C에서 가열하여 프라이머가 주형에 머닐링되도록 하였다. 서열번호 132 및 133으로 나타낸 프라이머 NS-PCR1 및 NS-PCR2를 사용하여 증폭된 후 Super02(Takara Shuzo)를 사용하여 정제된 iNOS cDNA(741bp)를 주형으로서 사용하였다. 0.625mM 각 dNTPs, 40mM HEPES-수산화칼륨 완충액(pH 7.8), 125mM 아세트산칼륨, 5.0mM 아세트산마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 0.0156 µg Pfu RNase H 및 0.66U BcaBEST DNA 폴리머라아제를 포함하는 40 µl의 혼합물을 가열 용액에 가하였다. 혼합물을 thermal cycler에서 1시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 5 µl의 각 반응 혼합물을 확인하기 위하여 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 11에 나타낸다. 도 11은 Pfu RNase H를 사용한 ICAN의 결과를 나타낸다. 레인 1: 분자량 마커(100bp); 레인 2: 10fg의 주형; 레인 3: 100fg의 주형; 레인 4: 1pg의 주형; 및 레인 5: 10pg의 주형.

도 11에 나타낸 바와 같이, 관심의 대상이 되는 증폭 산물은 100fg의 주형을 사용하여 관찰되었다.

#### 실시예 14

##### (1) RNA 제조

1)  $1.5 \times 10^6$  세포/ml의 농도로 10% 우태아 혈청(Gibco)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's 배지(Bio Whittaker, 12-604F)중에 RAW264.7 세포 (ATCC TIB 71)를 현탁시켰다. 5ml의 현탁액을 6-웰 마이크로티터 플레이트의 각 웰에 가하고 5% CO<sub>2</sub> 존재하에 밤새도록 37°C에서 인큐베이션시켰다. 흡출 5 µg/ml의 리로폴리사카라이드(LPS, Sigma) 용액 50 µl 및 흡출 1000U/µl의 인터페론-γ (INF-γ, Genzyme Technne) 용액 50 µl를 웰에 가하였다. 플레이트를 추가의 4시간동안 인큐베이션시켰다. 미어서, 키트에 첨부된 안내서에 따라 RNeasy Mini Kit(Qiagen, 74104)을 사용하여 세포로부터 RNA를 제조하였다. 음성 대조군으로서, LPS 또는 INF-γ를 가하지 않은 그룹을 사용하였다.

3 µg의 제조된 RNA, 10mM 트리스-하이드로클로라이드 완충액(pH 8.3), 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM 각 dNTPs, 150pmol의 무작위 6mers 프라이머, 60U의 리보뉴클레아제 저해제(Takara Shuzo) 및 15U의 역전사 효소 XL(AMV)(Takara Shuzo, 2620A)을 포함하는 60 µl의 혼합물을 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 미어서 99°C에서 5분동안 인큐베이션하여 thermal cycler(GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems)을 사용하여 효소를 불활성화시켜 cDNA를 제조하였다.

서열번호 92 및 93으로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 NS5 및 NS6를 마우스 유도 NO 신타아제(iNOS)의 mRNA의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다. 대조군으로서 서열번호 88 및 89로 나타낸 PCR용 프라이머 NS3 및 NS4 또한 합성하였다.

50pmol의 각 프라이머 NS5 및 NS6, 주형으로서 1 µl의 상기 기술된 바와 같이 합성된 cDNA 용액(50ng의 RNA에 상응) 또는 물을 사용한 그의 10-, 100-, 1000-, 또는 1000- 배 희석액, 0.5mM 각 dNTPs, 32mM HEPES-수산화칼륨 완충액(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 4.0mM 아세트산마그네슘, 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭사이드(DMSO), 0.0156 µg Pfu RNase H 및 0.66U BcaBEST DNA 폴리머라아제를 포함하는 50 µl의 혼합물을 Thermal Cycler에서 1시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 샘플을 분석시까지 -20°C에서 냉동시켜 저장하였다.

한편, 대조군으로서 PCR을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 50pmol의 각 프라이머 NS3 및 NS4, 주형으로서 1 µl의 상기 기술된 바와 같이 합성된 cDNA 용액(50ng의 RNA에 상응) 또는 물을 사용한 그의 10-, 100-, 1000-, 또는 1000- 배 희석액, 5 µl의 10 x Ex Taq 완충액(Takara Shuzo), 1.25U의 TaKaRa Ex Taq DNA 폴리머라아제(Takara Shuzo) 및 0.2mM 각 dNTPs를 포함하는 50 µl의 반응 혼합물을 Thermal Cycler를 사용하여 반응시켰다. 프로그램은 하기와 같았다: 2분동안 94°C에서 1사이클; 30초동안 94°C, 30초동안 55°C 및 30초동안 72°C에서 35사이클; 및 5분동안 72°C에서 1사이클. 반응 샘플을 분석시까지 -20°C에서 냉동시켜 저장하였다.

반응 후, 5 µl의 각 반응 혼합물(ICAN 또는 PCR)을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 12에 나타낸다. 도 12는 Pfu RNase H 또는 PCR를 사용하여 ICAN에 따라 iNOS를 검출한 결과를 보여준다. 레인 1: 100 bp DNA 레더 마커를 위한 레인; 레인 2: 음성 대조군 cDNA의 1000배 희석액; 레인 3: 음성 대조군 cDNA의 1000배 희석액; 레인 4: 음성 대조군 cDNA의 100배 희석액; 레인 5: 음성 대조군 cDNA의 10배 희석액; 레인 6: 음성 대조군 cDNA의 원 용액; 레인 7: LPS 및 INF-γ이 첨가된 음성 대조군 cDNA의 1000배 희석액; 레인 8: LPS 및 INF-γ이 첨가된 음성 대조군 cDNA의 100배 희석액; 레인 9: LPS 및 INF-γ이 첨가된 음성 대조군 cDNA의 10배 희석액; 레인 10: LPS 및 INF-γ이 첨가된 음성 대조군 cDNA의 원 용액.

도 12에 나타낸 바와 같이, LPS 및 INF-γ으로 처리된 세포로부터 제조된 cDNA를 주형으로서 사용하는 경우 ICAN 및 PCR에 대하여 증폭 산물이 관찰되었다. ICAN에 대하여 cDNA의 1000배 희석액을 사용하여 증폭 산물의 증가를 관찰하였다. PCR에 대하여, cDNA의 100배 희석액을 사용하여 증폭 산물의 증가를 관찰하였다.

#### 실시예 15

(1) 서열번호 90 및 91으로 나타난 올리고뉴클레오타이드 프라이머 4 및 5를  $\lambda$  DNA의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머 4는 75%의 6C 함량을 갖는 센스 프라이머이다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머 4는 80%의 6C 함량을 갖는 센스 프라이머이다.

120pmol의 각 프라이머 4 및 5, 2  $\mu$ l의 0.05% 프로필렌디아민 용액 및 10ng의 주형을 포함하는 10  $\mu$ l의 반응 시스템을 2분동안 98°C에서 열-변성시킨 후, 어닐링을 위해 신속하게 얼음상에서 냉각시켜 프라이머가 주형에 어닐링되도록 하였다. 실시예 2에 기술된 바와 같이 Super02를 사용하여 정제된 PCR 산물(1005bp)을 주형으로서 사용하였다.

(2) 어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 40mM Bicine-수산화칼륨 완충액(pH 8.3), 5.0mM 아세트 산마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% DMSO, 0.5  $\mu$ l의 씨모토가 마리티마(*Thermococcus maritima*) RNase H(0.58  $\mu$ g/ml) 및 2.2U BcaBEST DNA 폴리머라제를 포함하는 40  $\mu$ l의 혼합물을 가하여 1시간동안 60, 65, 또는 70°C에서 수행하였다. ICNA후 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 겔과를 도 13에 나타낸다. 도 13은 씨모토가 마리티마(*Thermococcus maritima*) RNase H를 사용한 ICAN 결과를 나타낸다. 레인 1: 분자량 마커(100bp); 레인 2: 10fg의 주형; 레인 3: 100fg의 주형; 레인 4: 1pg의 주형; 및 레인 5: 10pg의 주형.

도 13에 나타난 바와 같이, 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 각 반응 온도에서 관찰하였다.

#### 실시예 16

(1) 주형으로서 PCR 산물을 사용하여 ICAN에 따른 DNA 단편(알칼리-변성된)의 증폭을 조사하였다. 1fg 내지 10pg의 주형 및 1  $\mu$ l의 0.4N NaOH를 포함하는 1  $\mu$ l의 용액을 함께 혼합하였다. 혼합물을 5분동안 37°C에서 인큐베이션하여 주형을 변성시켰다. 상기 실시예 13에서 기술된 바와 같이 Super02(Takara Shuzo)를 사용하여 정제된 PCR-증폭 iNOS cDNA(741bp)를 주형으로서 사용하였다. 변성된 각 주형을 1  $\mu$ l의 0.4N HCl로 중화시켰다. 50pmol의 각 프라이머 NS1 및 NS2, 0.5mM dNTPs; 32mM HEPES-수산화칼륨 완충액(pH 7.8), 100mM 아세트 산칼륨, 4.0mM 아세트 산마그네슘, 0.01% BSA, 1.0% DMSO, 0.0156  $\mu$ g Pfu RNase H 및 0.66U BcaBEST DNA 폴리머라제를 포함하는 47  $\mu$ l의 혼합물을 가하였다. 혼합물을 thermal cycler에서 1시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동에 의해 분석하였다. 결과를 도 14에 나타낸다. 도 14는 알칼리-변성된 주형을 사용한 ICAN의 결과를 보여준다. 레인 1: 분자량 마커(100bp); 레인 2: 10fg의 주형; 레인 3: 100fg의 주형; 레인 4: 1pg의 주형 및 레인 5: 10pg의 주형.

도 14에 나타난 바와 같이 1pg의 주형을 사용하여 증폭 산물이 명백하게 증가되었다.

#### 실시예 17

(1) 주형을 변성시키기 않고 ICAN에 따라 DNA 단편을 증폭시키는 것을 조사하였다. 서열번호 92 및 93에 나타난 프라이머 NS5 및 NS6을 프라이머로서 사용하였다. DNA 주형을 실시예 13에서 제조된 것을 사용하였다. 10 fg 내지 100pg의 주형 또는 음성 대조군으로서 물, 50pmol의 각 프라이머 NS5 및 NS6, 0.5mM dNTPs, 32mM HEPES-수산화칼륨 완충액(pH 7.8), 100mM 아세트 산칼륨, 4.0mM 아세트 산마그네슘, 0.01% BSA, 1.0% DMSO, 0.0156  $\mu$ g Pfu RNase H 및 1U BcaBEST DNA 폴리머라제(Takara Shuzo)를 포함하는 50  $\mu$ l의 혼합물을 thermal cycler에서 1시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 후, 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동에 의해 분석하였다. 결과를 도 15에 나타낸다. 도 15는 주형을 변성시키지 않은 본 발명의 증폭 방법에 대한 전기영동 결과를 보여준다. 레인 1: 100bp DNA 래더 마커; 레인 2: 음성 대조군(물); 레인 3: 10fg의 주형; 레인 4: 100fg의 주형; 레인 5: 1pg의 주형; 레인 6: 10pg의 주형; 레인 7: 100pg의 주형.

도 15에 나타난 바와 같이 1pg의 주형을 사용하여 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 관찰하였음을 확인하였다.

#### 실시예 18

(1) 서열번호 94 및 95에 나타난 프라이머 pDON-A1-1 및 pDON-A1-2를 벡터 플라스미드 pDON-A1 DNA (Takara Shuzo)중 패키지 부위의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다.

(2) 주형을 변성하지 않은 ICAN에 따른 DNA 단편의 증폭

10 fg 내지 1ng의 pDON-A1 DNA 또는 음성 대조군으로서 물, 50pmol의 각 프라이머, 0.5mM dNTPs, 32mM HEPES-수산화칼륨 완충액(pH 7.8), 100mM 아세트 산칼륨, 4.0mM 아세트 산마그네슘, 0.01% BSA, 1.0% DMSO, 참고 실시예 4에서 제조된 0.0156  $\mu$ g Pfu RNase H 및 1U BcaBEST DNA 폴리머라제를 포함하는 50  $\mu$ l의 혼합물을 thermal cycler에서 1시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동에 의해 분석하였다. 결과를 도 16에 나타낸다. 도 16은 변성시키지 않고 주형으로서 환상 더블-스트랜드 DNA를 사용하여 본 발명에 대한 전기영동 결과를 보여준다. 레인 1: 100bp DNA 래더 마커; 레인 2: 음성 대조군(물); 레인 3: 10fg의 주형; 레인 4: 100fg의 주형; 레인 5: 1pg의 주형, 레인 6: 10pg의 주형; 레인 7: 100pg의 주형; 레인 8: 1ng의 주형.

도 16에 나타난 바와 같이, 10fg의 주형을 사용하여 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 관찰하였음을 확인하였다.

#### 실시예 19

본 발명의 방법을 사용하는 인간 유두종(human papilloma) 바이러스 16 유전자의 검출을 조사하였다. 0 인간 유두종 바이러스 16로 감염된 세포, CaSki cells (Dainippon Pharmaceutical; 세포내 500개의 인간 유두종 바이러스 16 카피를 포함)로부터 DNA를 주형으로서 사용하였다. 서열번호 96 및 97로 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 HPV16 S3 및 HPV16 A2를 HPV16 검출을 위한 프라이머로서 사용하였다. 프라이머 쌍을 사용하여 수득한 증폭 산물의 예상 크기는 약 120bp였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다: 1pg, 3pg, 30pg, 100pg, 300pg, 1ng, 3ng, 또는 10ng의 주형 DNA, 50pmol의 각 프라이머 HPV16 S3 및

HPV16 A2 최종 농도 0.01%의 프로필렌디아민을 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 제조하였다. Thermal Cycler Personal에서 98°C에서 2분 및 55°C에서 1분동안 인큐베이션시킨 후, 열응상에 방치하였다. 최종 농도 20mM HEPES-수산화칼륨 완충액(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 4.0mM 아세트산마그네슘, 0.01% BSA, 1.0% DMSO, 500  $\mu$ M 각 dNTPs, 30U E. Coli RNase H 및 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제를 포함하는 50  $\mu$ l의 혼합물을 55°C으로 세팅된 Thermal Cycler에 넣고 60분동안 반응시켰다. Thermal Cycler Personal중 매뉴얼에 따라 인간 유두종 바이러스 프라이머 HPV16(전향, 역향)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 예상된 증폭 산물의 크기는 140bp였다.

반응 후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 4% NuSieve 3:1 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 17A에 나타낸다. 도 17A는 ICAN 및 PCR을 사용하여 HPC16 유전자를 검출한 결과를 보여준다. 레인 M1: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 M2: 분자량 마커(50-2000 bp); 레인 1: 주형 없음; 레인 2: 1pg의 주형; 레인 3: 3pg의 주형; 레인 4: 30pg의 주형; 레인 5: 100pg의 주형; 레인 6: 300pg의 주형; 레인 7: 1ng의 주형; 레인 8: 3의 주형; 및 레인 9: 10ng의 주형.

도 17A에 나타난 바와 같이, 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 각각 ICAN에 대하여 3pg의 주형 DNA 및 PCR에 대하여 1pg의 주형 DNA를 사용하여 관찰하였음을 확인하였다.

또한, 서열번호 98로 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 HPV16 프로브를 사용하여 반응 산물에 대한 도트 블랏 하이브리드화를 수행하였다. 하이브리드화를 실시예 9와 같이 수행하였다. 결과를 도 17B에 나타낸다. 도 17B는 PCR 및 ICAN에 따른 HPV16 유전자의 도트 블랏 하이브리드화 검출 결과를 보여준다. 레인 1: 주형 없음; 레인 2: 1pg의 주형; 레인 3: 3pg의 주형; 레인 4: 30pg의 주형; 레인 5: 100pg의 주형; 레인 6: 300pg의 주형; 레인 7: 1ng의 주형; 레인 8: 3의 주형; 및 레인 9: 10ng의 주형.

도 17B에 나타난 바와 같이, PCR 및 ICAN의 검출 감수성은 거의 동일하였다. 따라서, 이를 방법은 바이러스 등의 검출에 효과적임을 확인하였다.

#### 실시예 20

임상검체 DNA 샘플로부터 인간 유두종 바이러스 16 유전자의 검출을 조사하였다. 사전동의서와 함께 얻은 6개의 임상검체로부터 통상의 방법에 따라 제조된 DNA를 주형으로서 사용하였다. 임상검체로부터 제조된 샘플중 감염성 HPVs의 형태를 PCR에 의해서 입증하였다. 실시예 19에서 기술된 프라이머 HPV16 S3 및 HPV16 A2를 검출용 프라이머로서 사용하였다. 주형으로서 사용하고자 하는 임상검체로부터 DNA 샘플의 농도를 TE 완충액으로 100ng/ $\mu$ l로 조정하였다. 반응 혼합물의 조성 및 반응 조건은 주형의 양을 제외하고 실시예 19에 기술된 바와 같았다. 또한 음성 대조군으로서 주형 DNA를 첨가하지 않은 반응 혼합물 및 양성 대조군으로서 HPV16으로 감염된 CaSki 세포 500pg를 포함하는 반응 혼합물을 사용하여 유사한 반응을 수행하였다. 반응 후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 4% NuSieve 3:1 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 18A에 나타낸다. 도 18A는 임상검체로부터 HPV16 유전자의 검출 결과를 나타낸다. 레인 1 내지 6: 임상검체; 레인 7: 음성 대조군; 및 레인 8: 양성 대조군.

도 18A에 나타난 바와 같이 약 120bp의 증폭 산물은 통상의 PCR에 의해 HPV16으로 감염된 것으로 입증된 샘플에 대하여 ICAN에 따라 관찰되었다. 다른 형태의 HPV16로 감염된 샘플 또는 비-감염 샘플에서는 증폭이 관찰되지 않았다.

또한, 실시예 9에서와 같이 증폭 산물에 대하여 도트 블랏 하이브리드화를 수행하였다. 결과를 도 18B 및 표 8에 나타낸다. 도 18B는 임상검체로부터의 HPV16 유전자의 도트 블랏 하이브리드화 검출 결과를 나타낸다. 레인 1 내지 6: 임상검체; 레인 7: 음성 대조군; 및 레인 8: 양성 대조군.

도 18B에 나타난 바와 같이, 전기영동에 의해 수득한 것과 일치하는 결과를 얻었고, PCR의 것과 유사한 결과를 전기영동 및 도트 블랏 하이브리드화를 사용하여 수득할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 방법에 따라 실제 임상검체로부터 HPV16이 검출될 수 있고 본 발명이 바이러스 등의 검출에 유효하다는 것을 확인하였다.

표 8

샘플	PCR 형태	HPV16 검출 프라이머를 사용한 ICAN 증폭
3번	비-감염	-
4번	비-감염	-
6번	유형 18	-
7번	유형 16	+
8번	유형 67	-
9번	유형 16	+
주형 없음	*	-
양성 대조군	*	+

- : 증폭 없음 + : 증폭 관찰됨

#### 실시예 21

임상검체로부터 HCV의 검출을 조사하였다. 검체 샘플을 시약에 첨부된 안내서에 따라 TRIzol 시약(Life Technologies)를 사용하여 사전동의서와 함께 얻은 HCV를 갖는 환자로부터의 300  $\mu$ l의 각각의 5개의 혈청 검체로부터 제조하고 6  $\mu$ l의 주사가능한 물(Otsuka Pharmaceutical)에 최종적으로 용해시켜 RAN 샘플을

수득하였다. 건강한 개인으로부터의 300  $\mu$ l의 혈청으로부터 유사하게 추출된 RNA를 음성 대조군으로서 사용하였다. 우선, 1 x RNA PCR 완충액, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM 각 dNTPs, 1U의 AMV 역전사효소 XL, 서열번호 99 및 100에 나타낸 10pmol의 각 프라이머 HCV-F 및 HCV-R, 및 2  $\mu$ l의 RNA 샘플중 하나를 포함하는 4  $\mu$ l의 반응 혼합물을 RNA PCR 키트(AMV) 버전 2.1(Takara Shuzo)을 사용하여 제조하였다. 혼합물을 10분동안 30°C에서 가온하고 30분동안 50°C에서 반응시켰다. 역전사후, ICAN을 수행하였다. 서열번호 101 및 102로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 HCV-F2 및 HCV-R1을 ICAN에 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다.

50pmol의 각 프라이머, 3  $\mu$ l의 역전사 반응 혼합물 중 하나 및 최종 농도 0.01%의 프로필렌디아민을 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 제조하였다. 3  $\mu$ l의 열균수를 블랭크로 사용하였다. 혼합물을 98°C에서 2분동안 인큐베이션시키고 신속하게 60°C으로 냉각시키고 1분동안 Thermal Cycler Personal에서 상기 온도에서 인큐베이션시키고 얼음상에서 저장하였다.

반응 후, 최종 농도 20mM HEPES-수산화칼륨 완충액(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 4.0mM 아세트산마그네슘, 0.01% BSA, 1.0% DMSO, 500  $\mu$ M 각 dNTPs, 30U E. Coli RNase H 및 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제를 혼합물에 가하여 열균수로 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 55°C으로 세팅된 Thermal Cycler에 놓고 60분동안 반응시켰다. 반응 후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3% NuSieve 3:1 마가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 19A에 나타낸다. 도 19A는 임상검체로부터 HCV 검출 결과를 보여준다. 레인 8: 주형으로서 열균수; 레인 1: 건강한 개인으로부터의 샘플; 레인 2 내지 6: HCV를 갖는 환자로부터의 샘플; 및 레인 M: 분자량

도 19A에 나타난 바와 같이 HCV 게놈의 뉴클레오타이드 서열로부터 예상되는 약 170bp의 증폭 산물을 HCV를 갖는 환자로부터의 RNA 샘플에 대해서만 관찰하였고, 건강한 개인으로부터의 혈청 및 블랭크에 대해서는 증폭 산물이 관찰되지 않았다. 또한 ICAN-증폭 산물에 대한 도트 블랏 하이브리드화를 5'-말단에서 바이오티나화된 서열번호 103으로 나타낸 HCV에 대한 프로브를 사용하여 실시예 9에 기술된 바와 같이 수행하였다. 결과를 도 19B에 나타낸다. 도 19B에서 샘플에 대한 레인은 전기영동에 대하여 나타난 것과 같다.

도 19에 나타난 바와 같이 전기영동으로부터의 결과는 도트 블랏 하이브리드화의 결과와 일치한다는 것을 확인하였다. 본 결과로 본 발명의 방법이 실제 임상검체로부터의 HCV 검출에 사용될 수 있고 바이러스 등의 검출에 효과적임을 확인하였다.

실시예 22

아데노바이러스 검출 방법을 조사하였다.

서열번호 104 내지 106으로 나타낸, E1A (종양 유전자), E1A-1 (센스), E1A-2 (안티센스) 및 E1A-3 (안티센스)를 증폭시키기 위한 프라이머를 아데노바이러스 (GenBank 기탁번호 J01917)의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 작성하였다. 아데노바이러스 (ATCC 기탁번호 VR-5)를 사용하였다. 주형을 하기와 같이 제조하였다.  $8.73 \times 10^5$  PFU/ml의 농도로 아데노바이러스를 포함하는 100  $\mu$ l의 용액을 최종 농도 0.1%의 SDS 및 최종 농도 0.2mg/ml의 프로테나제 K의 존재하에 1시간동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. DNA를 실리카겔에 흡착에 의해 정제하였다. 열균수로 정제된 DNA를 희석하여 제조된  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 또는  $10^1$  PFU에 상응하는 아데노바이러스 DNAs를 사용하였다. 간단하게, 60pmol의 각 프라이머 E1A-1 및 E1A-2(종폭 길이: 112bp) 또는 E1A-1 및 E1A-3(종폭 길이: 91bp), 2  $\mu$ l의 0.05% 프로필렌디아민 및 주형을 포함하는 10  $\mu$ l의 반응 시스템을 2분동안 94°C에서 열변성시키고 얼음상에서 급속 냉각시켜 프라이머가 주형에 어닐링되도록 하였다.

반응 후, 0.625mM 각 dNTPs, 42.5mM Tricine-수산화칼륨 완충액(pH 8.5), 5.0mM 아세트산칼륨, 0.0125% BSA, 1.25% DMSO, 30U E. Coli RNase H 및 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제를 혼합물에 가하여 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 60°C에서 1시간동안 인큐베이션시켰다. 대조군으로서, PCR에 의한 검출을 상기와 동일한 온도 및 서열번호 107, 108 및 142로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 E1A (종양 유전자), E1A-1P (센스), E1A-2P (안티센스) 및 E1A-3P(안티센스)를 증폭시키기 위한 프라이머를 사용하여 수행하였다. PCR을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 60pmol의 각 프라이머 E1A-1 및 E1A-2P(종폭 길이: 112bp) 또는 E1A-1 및 E1A-3P(종폭 길이: 91bp), 5  $\mu$ l의 10 x Ex Taq 완충액(Takara Shuzo), 1.25U TaKaRa Ex DNA 폴리머라제(Takara Shuzo) 및 0.2mM dNTPs를 포함하는 50  $\mu$ l의 PCR 용액을 제조하였다. PCR을 위한 조건은 하기와 같았다: 94°C에서 30초동안, 55°C에서 30초동안 및 72°C에서 30초.

반응 후, ICAN 및 PCR을 위한 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 마가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 20 및 표 9에 나타낸다. 도 20은 아데노바이러스 입자로부터의 바이러스 E1A 유전자의 검출 결과를 보여준다. 레인 1 내지 10은 프라이머 E1A-1 및 E1A-2 결합물을 사용해 얻은 결과를 보여준다. 레인 11 내지 20은 프라이머 E1A-1 및 E1A-3 결합물을 사용해 얻은 결과를 보여준다. 레인 1: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 2:  $10^4$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 ICAN; 레인 3:  $10^3$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 ICAN; 레인 4:  $10^2$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 ICAN; 레인 5:  $10^1$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 ICAN; 레인 6: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 7:  $10^4$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 PCR; 레인 8:  $10^3$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 PCR; 레인 9:  $10^2$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 PCR; 및 레인 10:  $10^1$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 PCR. 또한, 레인 11: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 12:  $10^4$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 ICAN; 레인 13:  $10^3$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 ICAN; 레인 14:  $10^2$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 ICAN; 레인 15:  $10^1$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 ICAN; 레인 16: 분자량 마커(100 bp 레더); 레인 17:  $10^4$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 PCR; 레인 18:  $10^3$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 PCR; 레인 19:  $10^2$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 PCR; 및 레인 20:  $10^1$  PFU에 상응하는 DNA를 사용한 PCR.

표 9

증폭 크기 (bp)	검출 한도	
	ICAN	PCR
112	10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>
91	10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>

도 20 및 표 9에 나타난 바와 같이, ICAN에 의한 마데노바이러스 E1A 유전자의 검출 감수성이 PCR에 의한 것과 일치한다는 것을 확인하였다.

#### 실시예 23

레트로바이러스 벡터로 감염된 세포로부터 통합 바이러스 유전자의 검출을 조사하였다. 레트로바이러스 및 게놈 DNA로 감염된 세포를 하기와 같이 제조하였다. 간단하게, 인산칼슘 방법에 따라 벡터 플라스미드 pDON-A1 (Takara Shuzo)를 패키징 세포 6PE+86LH로 삽입하였다. 동종숙주적 벡터를 삽입 세포의 배양 상층액으로부터 제조하였다. NIH/3T3:tpvhmf 동종숙주적 벡터로 감염시키고 감염된 세포를 14일동안 G418을 포함하는 배지중에서 배양하여 바이러스 벡터로 감염된 세포를 제조하였다. 통상의 방법에 따라 27 µg의 게놈 DNA를 레트로바이러스로 감염된 4 x 10<sup>6</sup>의 제조된 세포로부터 수득하였다. 실시예 18(1)에 기술된 프라이머 pDON-A1-1 및 pDON-A1-2를 프라이머로서 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 60pmol의 각 프라이머, 2 µl의 0.25%의 프로필렌디아민 수용액 및 0.1ng 내지 1000ng 주형으로서 게놈 DNA를 포함하는 10 µl의 반응 시스템을 thermal cycler(Takara Shuzo) 2분동안 98°C 이후 60°C에서 가열하여 프라이머가 주형에 어닐링되도록 하였다.

반응후, 0.625mM 각 dNTPs, 40mM HEPES-수산화칼륨 완충액(pH 7.8), 125mM 아세트산칼륨, 5.0mM 아세트산 마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭시드(DMSO), 30U E.Coli RNase H 및 0.55U BcaBEST DNA 폴리머라제를 포함하는 40 µl의 혼합물을 가하여 최종 용량 50 µl로 하였다. 반응 혼합물을 thermal cycler에서 1시간동안 60°C에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 5 µl의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 추가로, ICAN 및 PCR에 의해 DNA를 검출하는 감수성을 비교하기 위하여 서열번호 111 및 112로 나타낸 프라이머 pDON-A1-3 및 pDON-A1-4를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR을 하기와 같이 수행하였다. 0.1ng 내지 100ng의 주형, 60pmol의 각 프라이머, 1.25U의 TaKaRa Ex Taq DNA 폴리머라제(Takara Shuzo) 및 0.2mM 각 dNTPs를 포함하는 50 µl의 반응 혼합물을 Thermal Cycler를 사용하여 하기와 같이 반응시켰다: 30초동안 94°C에서 30초동안 55°C 및 30초동안 72°C에서 35사이클. 반응 후, 5 µl의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 도 21에 결과를 나타낸다. 도 21은 ICAN 및 PCR에 따라 레트로바이러스 벡터로 감염된 세포로부터의 통합 바이러스 유전자 검출 결과를 나타낸다. 레인 1: 분자량 마커(100bp); 레인 2: 1000ng의 주형; 레인 3: 100ng의 주형; 레인 4: 10ng의 주형; 레인 5: 1ng의 주형; 및 레인 6: 0.1ng의 주형.

도 21에 나타난 바와 같이, 관심의 대상이 되는 증폭 산물은 1ng의 주형 DNA를 사용한 ICAN 및 1ng의 주형 DNA를 사용한 35사이클의 PCR에 대하여 관찰되었다.

#### 실시예 24

본 발명의 증폭 방법 및 하이브리드화 방법을 조합된 표적 핵산 검출 방법을 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157 벡토록소 1의 검출을 위해 연구하였다. 장출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157의 벡토록소 1의 유전자를 표적으로서 선택하였다. 주형 DNA를 실시예 8(1)과 같이 제조하였다. 약 40%의 GC 함량을 갖는 약 80bp의 부위를 증폭했다. 서열번호 113 및 114로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 VT1-IF4 및 VT1-IR1을 프라이머로서 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 60pmol의 프라이머 VT1-IF4 및 VT1-IR1, 최종 농도 0.01%의 프로필렌디아민, 0 내지 10<sup>6</sup>개의 세포에 상응하는 온수-추출액 및 멸균수를 포함하는 5 µl의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 2분동안 98°C에서 열-변성시킨 후, Thermal Cycler Personal(Takara Shuzo)에서 1분동안 상기 온도에서 인큐베이션시키고 어닐링을 위해 열음상에 방치하였다.

어닐링 후, 최종 농도 20mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭시드(DMSO), 500 µM 각 dNTPs, 2.75U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 15U E.coli RNase H를 혼합물에 가하여 멸균수로 최종 용량을 25 µl로 하였다. 반응 혼합물을 55°C으로 세팅된 Thermal Cycler Personal상에 방치하고, 60분동안 상기 온도에서 인큐베이션시켰다. 대조군으로서 Thermal Cycler Personal을 사용하여 매뉴얼에 따라 0-157 Typing Set(Takara Shuzo)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR을 하기와 같이 수행하였다: 1분동안 94°C, 1분동안 55°C, 1분동안 72°C에서 35사이클. 상기 반응을 위해 필요한 총 시간은 약 145분이었다. 증폭 산물의 예상된 크기는 349bp였다. 반응후, 3 µl의 각 반응 혼합물을 3.0% NuSieve 3:1 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. ICAN에 대한 결과를 도 22에 나타낸다. 도 22는 0-157 벡토록소 1 유전자의 검출에 대한 결과를 보여준다. 레인 M: 분자량 마커(50-2000 bp); 레인 N: 주형으로서 멸균수; 레인 1: 1개의 세포에 상응하는 주형; 레인 2: 10개의 세포에 상응하는 주형; 레인 3: 10<sup>2</sup>개의 세포에 상응하는 주형; 레인 4: 10<sup>3</sup>개의 세포에 상응하는 주형. 또한, ICAN 및 PCR에 의한 검출 결과를 표 10에 나타낸다.

표 10

에스케리키아 콜라이( <i>Escherichia coli</i> ) 0-157 세포			
	0	1	10
ICAN	-	+	+++
PCR	-	+	+++

: 증폭되지 않음; + 내지 +++는 3단계의 증폭 정도를 나타낸다.

표 10에 나타낸 바와 같이, ICAN 및 PCR 모두를 사용한 1개의 세포에 상응하는 온수-추출액을 사용하여 반응 시스템에서 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 관찰하였다. 또한, 프로브로서 5'-말단에 바이오틴으로 표시된 서열번호 115로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 VT1을 사용하여 증폭 산물에 대하여 도트 블랏 하이브리드화를 수행하였다. 하이브리드화를 실시에 19와 같이 수행하였다. 결과는 전기영동에 의한 결과와 일치하였다. 따라서, ICAN의 검출 감수성은 PCR의 것과 일치한다는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명의 ICAN를 사용하여 증폭 반응을 위해 요구되는 시간은 PCR를 위해 요구되는 것과 비교하여 1/2 이하였다. 따라서, 본 발명의 ICAN이 병원성 박테리움 등을 검출하기 위해 유효하다는 것이 입증되었다.

#### 실시예 25

보툴리눔(*botulinum*) 독소 A형에 대한 유전자를 검출하는 방법을 조사하였다. 식중독 케이스, type A-190로부터의 군주 클로스트리움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)로부터의 DNA를 주형으로서 사용하였다. 이 군주는 Department of Hygiene, Kagawa Nutrition University에 보관되어 있다. 검출용 프라이머로서 서열번호 116 및 117에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 BotA S2 및 BotA A2를 합성하였다. 상기 프라이머를 사용하여 수득한 증폭 산물의 크기는 약 150bp였다. 1 µl의 평균수중 주형으로서 사용되는 A형 독소-생산 클로스트리움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)으로부터 100fg, 1pg, 10pg 또는 100pg의 DNA를 포함하는 용액을 제조하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다.

50pmol의 프라이머, 최종 농도 0.01%의 프로판렌디아민, 주형으로서 1 µl의 DNA 용액중 하나를 포함하는 10 µl의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 실시에 19에 기술된 반응 혼합물의 조성 및 반응 조건을 사용하여 ICAN하였다. 대조군으로서 보툴리눔(*botulinum*) 독소 A형에 대한 유전자를 검출하기 위한 프라이머 세트, BAS-1 및 BAS-2 (Takara Shuzo)를 사용하여 Thermal Cycler Personal에서 매뉴얼에 따라 PCR를 수행하였다. 증폭 산물의 예상 크기는 284bp였다.

반응 후, 3 µl의 각 반응 혼합물을 4.0% NuSieve 3:1 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 23A에 나타낸다. 도 23A는 ICAN 및 PCR에 따른 보툴리눔(*botulinum*) 독소 A형에 대한 유전자 검출 결과를 나타낸다. 레인 M1: 분자량 마커(100bp); 레인 M2: 분자량 마커(50-2000 bp 마커); 레인 1: 주형 없음; 레인 2: 100fg의 주형; 레인 3: 10pg의 주형; 및 레인 4: 100pg의 주형.

도 23A에 나타낸 바와 같이, 관심의 대상이 되는 증폭 산물은 100fg의 주형 DNA를 ICAN에 따라 사용한 반응에서 관찰되었다. 한편, 관심의 대상이 되는 증폭 산물은 100fg의 주형 DNA를 PCR에 따라 사용한 반응에서는 관찰되지 않았다. 또한, 반응 산물에 대한 도트 블랏 하이브리드화를 서열번호 118에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 BotA 프로브를 사용하여 수행하였다. 도트 블랏 하이브리드화를 실시에 9에 기술한 바와 같이 수행하였다. 결과를 도 23B에 나타낸다. 도 23B에 나타낸 바와 같이, 시그널은 각각 ICAN에 대하여 100fg의 주형을 사용하고 PCR에 대하여 10pg의 주형을 사용하여 관찰되었다. 이 결과는 전기영동의 결과와 일치하였다.

#### 실시예 26

크리산썬(Chrysanthemum) 비로이드의 검출을 조사하였다. JP-A 9-140383의 실시예 1에 기술된 바와 같은 국화 왜화증(*Chrysanthemum Stunt Viroid*) (CSVD)로 감염된 크리산썬(*chrysanthemum*)으로부터 저분자 RNA를 추출하는 방법에 따라 수득한 저분자 RNA의 10배 연속 희석액을 제조하였다. 역전사 반응을 RNA PCR 키트 (AMV) 버전 2.1 (Takara Shuzo)를 사용하여 수행하였다. 특히, 1 x RNA PCR 완충액, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM 각 dNTPs, 20U의 RNase 저해제, 5U의 AMV 역전사효소 XL, 50pmol 무작위 9mers, 1 µl의 RNA의 연속 희석액중 하나를 포함하는 역전사 반응 혼합물 20 µl를 제조하였다. 혼합물을 30°C에서 10분에서 가온시키고 55°C에서 30분동안 가열하고 5분동안 99°C에서 가열하여 역전사 효소를 불활성화시켰다. 냉각후 ICAN을 수행하였다. 1 µl의 역전사 반응 혼합물을 ICAN을 위한 50 µl의 반응 혼합물에 대하여 주형으로서 사용하였다. 서열번호 119 및 120을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 CSVD-F4 및 CSVD-R3를 본 실시예에서 프라이머로서 사용하였다. 반응 온도가 60°C이고 Thermal Cycler MP를 사용한 것을 제외하고 실시예 19에 기술된 바와 같이 반응을 수행하였다. 반응 후, 3 µl의 각 반응 혼합물을 3% Nucleave 3:1 아가로스겔상에서 전기영동시켰다.

한편, 주형으로서 1 µl의 동일한 역전사 반응 혼합물을 사용하여 50 µl의 반응 시스템에서 PCR 증폭을 수행하였다. 서열번호 109 및 110으로 나타낸 프라이머 F 94 및 R264를 프라이머로서 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 반응 혼합물을 프로토콜에 따라 Takara PCR Amplification kit를 사용하여 제조하였다. 10pmol 각 프라이머 및 1 µl의 역전사 반응 혼합물을 가하여 최종 용량을 50 µl로 하였다. 증폭 반응은 Thermal Cycler MP를 사용하여 반응을 하기와 같이 수행하였다: 30초동안 94°C, 30초동안 55°C 및 30초동안 72°C에서 30사이클. 반응 후 5°C의 각 반응 혼합물을 5 µl의 각 반응 혼합물을 3% Nucleave 3:1 아가로스겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 표 11에 나타낸다.

표 11

주형으로서 RNA의 회석비율	$\times 10^1$	$\times 10^1$
RT-ICAN	++	+
RT-PCR	+	-

- : 증폭되지 않음. +: 증폭 ++: 우수한 증폭

표 11에 나타난 바와 같이 ICAN에 따라  $10^1$ 배 회석된 RNA 샘플을 주형으로 사용한 반응에서 증폭 산물이 관찰되었다. 한편, PCR에 따라  $10^1$ 배 회석된 RNA 샘플을 주형으로 사용한 반응에서 증폭 산물이 관찰되었다.

또한, ICAN-증폭 산물 및 PCR-증폭 산물이 도트 블랏 하이브리드화에 의해 관심의 대상이 되는 산물로 확인되었다. 도트 블랏 하이브리드화를 5'-말단에 바이로링으로 표지된 서열번호 121로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 CSVD 프로브를 사용하여 수행하였다. 실시예 9에서와 같이 하이브리드화를 수행하였다. 결과는 전기영동과 일치하였다. 시그널은 각각 ICAN에 대하여  $10^1$ 배 회석된 RNA 샘플 및 PCR에 대하여  $10^1$ 배 회석된 RNA 샘플에서 관찰되었고, 이는 PCR보다 ICAN이 더욱 감수성임을 입증한다.

#### 실시예 27

Pfu RNase H를 사용하여 크리산썬들 드와핑 비로이드(*ohryanthum dwarfing viroid*) (CSVD)로 감염된 크리산썬들(*ohryanthum*)으로부터 비로이드 유전자를 검출하는 것을 조사하였다. 3  $\mu$ l의 실시예 26에서 제조된 RNA의 10배 연속 희석액 중 하나, 10mM tris-히이드로클로라이드 완충액(pH 8.3), 50mM 염화칼륨, 5mM 염화마그네슘, 1mM 150pmol 무작위 6mers, 60U의 RNase 저해제(Takara Shuzo) 및 15U의 역전사효소 XL(AMV)(Takara Shuzo)를 포함하는 60  $\mu$ l의 혼합물을 thermal cycler(GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems)를 사용하여 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간동안 인큐베이션시키고 99°C에서 5분동안 가열하여 효소를 불활성시켜 cDNA를 제조하였다. 서열번호 122 내지 125로 나타낸 프라이머 Vd1, Vd2, Vd3, 및 Vd4를 비로이드에 대한 mRNA의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다.

50pmol의 각 프라이머 Vd1 및 Vd2, 상기 기술된 바와 같은 1배의 cDNA, 주형으로서 물로의 10-, 100-, 1000- 또는 10000-배 희석액 또는 음성 대조군을 위해 물, 0.5mM 각 dNTPs, 32mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 4.0mM 아세트산마그네슘, 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭시드(DMSO), 0.156  $\mu$ g의 Pfu RNase H 및 1U BcaBEST DNA 폴리머라제를 포함하는 50  $\mu$ l의 혼합물을 Thermal Cycler에서 1시간동안 57°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 샘플을 분석시까지 -20°C에서 냉동시켜 저장하였다.

PCR을 대조군으로서 수행하였다. 간단하게, 50pmol의 각 프라이머 Vd3 및 Vd4, 상기 기술된 바와 같은 1  $\mu$ l의 cDNA 용액, 주형으로서 물로의 10-, 100-, 1000- 또는 10000-배 희석액 또는 음성 대조군을 위해 물, 5  $\mu$ l의 10 x Ex Taq 완충액, 1.25U Takara Ex Taq 폴리머라제 및 0.2mM 각 dNTPs를 포함하는 50  $\mu$ l의 반응 시스템을 Thermal Cycler에서 하기와 같이 반응시켰다. 30초 94°C, 30초 55°C 및 30초 72°C에서 35 사이클; 및 5분동안 72°C에서 1사이클. 반응 샘플을 분석시까지 -20°C에서 냉동시켜 저장하였다.

5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 24에 나타낸다. 도 24는 Pfu RNase H를 사용한 ICAN 및 PCR에 따른 비로이드 검출 결과를 나타낸다. 레인 M: 100 bp DNA 레더 마커; 레인 2: 음성 대조군; 레인 3: cDNA의 1000배 희석액; 레인 4: cDNA의 1000배 희석액; 레인 5: cDNA의 100배 희석액; 레인 6: cDNA의 10배 희석액; 및 레인 7: cDNA 원액.

도 24에 나타낸 바와 같이, 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 ICAN 및 PCR에 대하여 cDNA의 100배 희석액에서 관찰하였다.

K-ras 유전자 검출을 연구하였다.

#### (1) 게놈 DNA 검출

인간 c-Ki-ras의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 서열번호 126 및 127로 나타낸 프라이머 c-Ki-ras-1 및 c-Ki-ras-2를 작성하였다.

60pmol의 각 프라이머, 2  $\mu$ l의 0.25% 프로판렌디아민 수용액 및 주형으로서 1ng 내지 100ng 인간 게놈 DNA(Clontech)를 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 Thermal Cycler Personal에서 2분동안 98°C. 이어서 53°C에서 열-변성시켜 프라이머를 주형에 어닐링시켰다.

어닐링 후, 0.625mM 각 dNTPs, 40mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 125mM 아세트산칼륨, 5.0mM 아세트산마그네슘, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭시드(DMSO), 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 30U E.coli RNase H를 포함하는 40  $\mu$ l의 혼합물을 가하여 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 53°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 후, 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다.

한편, 대조군으로서 PCR을 수행하였다. 서열번호 128 및 129로 나타낸 프라이머 c-Ki-ras-3 및 c-Ki-ras-4를 프라이머로서 사용하였다. 60pmol의 각 프라이머, 0.1ng 내지 100ng의 주형, 5  $\mu$ l의 10 x Ex Taq 완충액, 1.25U의 Takara Ex Taq DNA 폴리머라제 및 0.2mM 각 dNTPs를 포함하는 50  $\mu$ l의 반응 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 Thermal Cycler를 사용하여 하기와 같이 반응시켰다: 30초동안 94°C에서 30초동안 55°C 및 30초동안 72°C에서 30 또는 35사이클. 반응 후, 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 도 25에 결과를 나타낸다. 도 25는 ICAN 및 PCR에 따라 인간 게놈 DNA로부터 c-Ki-ras



ICAN에 대하여 레인 1: 분자량 마커; 레인 2: 100ng의 주형; 레인 3: 10ng의 주형; 레인 4: 1ng의 주형; 레인 5: 주형 없음. PCR에 대하여 레인 1: 100ng의 주형; 레인 2: 10ng의 주형; 레인 3: 1ng의 주형.

도 25에 나타난 바와 같이, 관심의 대상이 되는 증폭 산물은 1ng의 주형 DNA를 사용한 ICAN 및 10ng의 주형 DNA를 사용한 30사이클의 PCR에 대하여 관찰되었다. 1ng 내지 100ng의 주형을 사용하여 ICAN 및 PCR에 의해 수득된 증폭 산물의 양에 대한 비교 결과를 도 30에 나타낸다. 도에서, 빗금친(shaded) 바는 30사이클의 PCR의 결과를 도트 바는 ICAN에 대한 결과를 각각 나타낸다. 도 30에 나타난 바와 같이 ICAN에 의해 수득한 증폭 산물의 양이 PCR에 의한 것보다 많음을 확인하였다.

## (2) 혈액 샘플의 검출

항응고제로서 시트르산나트륨 또는 헤파린을 사용하여 건강한 개체로부터 회수된 100  $\mu$ l의 혈액 샘플로부터 Dr. GENTLE™(Whole Blood)(Takara Shuzo)를 사용하여 게놈 DNA를 제조하였다. 0.04 내지 5  $\mu$ l의 혈액에 상응하는 제조된 DNA를 사용하여 상기 (1)에 기재된 바와 같이 ICAN에 의해 c-Ki-ras 유전자를 검출하였다. 또한, ICAN 및 PCR에 의해 DNA를 검출하는 감수성을 비교하기 위하여 0.04 내지 5  $\mu$ l의 혈액에 상응하는 제조된 DNA를 사용하여 상기 (1)에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 c-Ki-ras 유전자를 검출하였다. 결과를 도 26에 나타낸다. 도 26은 ICAN 및 PCR에 의해 혈액 샘플로부터의 c-Ki-ras 유전자 검출 결과를 나타낸다. ICAN에 대하여 레인 1: 분자량 마커; 레인 2: 5  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액; 레인 3: 1  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액; 레인 4: 0.2  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액; 레인 5: 0.04  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액; 레인 6: 5  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액; 레인 7: 1  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액; 레인 8: 0.2  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액; 레인 9: 0.04  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액. PCR에 대하여 레인 1: 분자량 마커; 레인 2: 5  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액 30사이클; 레인 3: 1  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액 30사이클; 레인 4: 0.2  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액 30사이클; 레인 5: 0.04  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액 30사이클; 레인 6: 5  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액 35사이클; 레인 7: 1  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액 35사이클; 레인 8: 0.2  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액 35사이클; 레인 9: 0.04  $\mu$ l의 시트르산 처리된 혈액 35사이클; 레인 10: 5  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액 30사이클; 레인 11: 1  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액 30사이클; 레인 12: 0.2  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액 30사이클; 레인 13: 0.04  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액 30사이클; 레인 14: 5  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액 35사이클; 레인 15: 1  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액 35사이클; 레인 16: 0.2  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액 35사이클; 레인 17: 0.04  $\mu$ l의 헤파린 처리된 혈액 35사이클.

도 26에 나타난 바와 같이, 관심의 대상이 되는 증폭 산물은 ICAN에 대한 어느 샘플 0.2  $\mu$ l에 상응하는 게놈 DNA, 및 30사이클의 PCR(시트르산 처리 또는 헤파린 처리)에 대한 어느 샘플 0.2  $\mu$ l에 상응하는 게놈 DNA를 사용하여 각각 관찰되었다. 1ng 내지 100ng의 주형을 사용하여 ICAN 및 PCR에 의해 수득된 증폭 산물의 양에 대한 비교 결과를 도 30에 나타낸다. 도에서, 빗금친 바는 30사이클의 PCR의 결과를 도트 바는 ICAN에 대한 결과를 각각 나타낸다. 도 30에 나타난 바와 같이 ICAN에 의해 수득한 증폭 산물의 양이 PCR에 의한 것보다 많음을 확인하였다.

## 실시예 29

Bca RNase HIII를 사용하여 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli) 0-157 베토크스 2 (VT-2) 유전자 검출을 연구하였다. 장출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157를 노보바이신을 포함하는 mEC 배지에서 42°C에서 18시간동안 배양한 후, 멸균수중 0, 1, 10, 101, 102, 또는 103에 상응하는 희석액을 주형으로서 제조하였다. 검출을 위해 서열번호 130 및 131에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 VT-2 1F4 및 VT-2 1R3를 합성하였다. 프라이머쌍을 사용하여 수득된 증폭 산물의 크기는 146bp였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 50pmol의 프라이머, 최종 농도 0.01%의 프로필렌다이민 및 온수-추출액중 하나를 포함하는 10  $\mu$ l의 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 Thermal Cycler Personal(Takara Shuzo)에서 2분동안 98°C에서 가열한 후, 1분동안 55°C에서 인큐베이션시키고 얼음상에 방치하였다. 최종 농도 34mM Tricine-수산화칼륨(pH 8.7), 10mM 염화칼륨, 10mM 황산암모늄, 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭시드(DMSO), 4mM 아세트산칼륨, 500  $\mu$ M 각 dNTPs, 5.5U BcaBEST DNA 폴리머라제 및 5.5U 참고 실시예 3(5)에 기술된 Bca RNase H를 혼합물에 가하여 멸균수로 최종 용량을 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 55°C로 세팅된 Thermal Cycler Personal상에 방치하고 60분동안 상기 온도에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% NuSieve 3:1 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 27에 나타낸다. 도 27은 Bca RNase H를 사용한 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157 베토크스 2 (VT-2) 유전자 검출 결과를 보여준다. 레인 M: 분자량 마커(100 bp); 레인 N: 주형으로서 멸균수; 레인 1: 1개의 세포에 상응하는 주형; 레인 2: 10개의 세포에 상응하는 주형; 레인 3: 102개의 세포에 상응하는 주형; 레인 4: 103개의 세포에 상응하는 주형.

도 27에 나타난 바와 같이 VT2 유전자는 ICAN에 따라 1개의 세포에 상응하는 온수-추출액을 사용하여 검출되었다. 이 결과를 실시예 9에서 기술된 PCR 및 E.Coli RNase H를 사용하여 ICAN에 따른 검출 반응과 일치하였다. 따라서 열내성 RNase H, Bca RNase HIII를 사용한 ICAN 또한 바이러스, 박테리움 등의 검출에 효과적이라는 것을 확인하였다.

## 실시예 30

스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 장관내 독소 A 유전자 검출을 연구하였다. 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 장관내 독소 A 유전자 부위의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 서열번호 136 및 137에 나타난 프라이머 SEA-1 및 SEA-2를 합성하였다. 115pg 또는 1.15ng의 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(ATCC 기탁번호 13565)로부터 게놈 DNA 또는 음성 대조군을 위해 50pmol의 각 프라이머, 0.5mM 각 dNTPs, 32mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 4.0mM 아세트산마그네슘, 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭시드(DMSO), 0.156  $\mu$ g의 Pfu RNase H 및 1U BcaBEST DNA 폴리머라제를 포함하는 50  $\mu$ l의 혼합물을 Thermal Cycler에서 1시간동안 58°C에서 인큐베이션시켰다. 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 29에 나타낸다. 도 29는 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 장관내독소 A 유전자에 대한 결과를 나타낸다. 레인 1: 분자량 마커 (100 bp 레더); 레인 2: 음성 대조군 (멸균수); 레인 3: 115pg의 주형; 및 레인

#### 4: 1.15의 주형.

도 29에 나타난 바와 같이 관성의 대상이 되는 증폭 산물이 약 1.15의 주형을 사용하여 관찰되었다.

#### 실시예 31

C형 간염 바이러스(HCV)의 검출을 연구하였다. 서열번호 138 및 139로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 HCV-F3 및 HCV-R1을 HCV의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다. 주형 DNA를 하기와 같이 제조하였다. 간단한 개체 또는 HCV로 감염된 환자의 혈청 100 µl로부터 실시예 21에 기술된 바와 같이 제조된 RNA, 10mM Tris-HCl로 클로로라이드(pH 8.3), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM 각 dNTPs, 10pmol 무작위 9mers 및 10U 역전사효소 XL(Takara Shuzo)를 포함하는 4 µl의 혼합물 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간 동안 인큐베이션시키고 Thermal Cycler(GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems)를 사용하여 99°C에서 5분 동안 가열하고 30분 동안 가열하고 5분 동안 99°C에서 가열하여 역전사 효소를 불활성화시켜 cDNA를 제조하였다.

1 µl의 cDNA 반응 혼합물 및 100pmol의 프라이머 HCV-F3 및 HCV-R1을 사용하는 것을 제외하고 실시예 13에 기술된 바와 같이 ICAN을 55°C에서 1시간 동안 수행하였다. 반응 후, 2.5 µl의 각 반응 혼합물을 3X 마가로스겔에서 전기영동시켰다. 결과를 도 31에 나타낸다. 도 31은 C형 간염 바이러스 검출의 전기영동 결과를 보여준다. 레인 1: 분자량 마커(100bp); 레인 2: 건강한 개체로부터의 혈청으로부터 제조된 주형; 레인 3 내지 6: HCV에 감염된 환자로부터 제조된 주형.

도 31에 나타난 바와 같이 HCV는 특히 HCV로 감염된 환자로부터 혈청 샘플로부터 검출될 수 있다고 확인하였다.

#### 실시예 32

본 발명의 증폭 방법을 연구하였다.

(1) 주형으로서 실시예 2(2)에서 제조된 pUC19-150 플라스미드 DNA 및 서열번호 35 및 36에 나타낸 프라이머 MCS-F 및 MCS-R를 사용하여 PCR을 수행하였다. 534bp의 PCR 증폭 단편을 Microcon-100 (Millipore)를 사용하여 반응 혼합물을 정제하여 수득하였다. 15ng의 PCR 단편 및 5'-말단에 인산화에 의해 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]으로 표지된 서열번호 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 30pmol 프라이머 MR2 및 5 µl까지 멸균 증류수를 포함하는 반응 혼합물 및 추가로 서열번호 141로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 30pmol 프라이머 MR1을 포함하는 반응 혼합물을 제조하였다. 반응 혼합물을 98°C 2분에서 열-변성시키고 55°C로 냉각시켰다. 1U BcaBEST DNA 폴리머라제를 포함하는 20 µl의 반응 혼합물(42.5mM 34mM Tricine-수산화칼륨(pH 8.7), 12.5mM 염화칼륨, 10mM 황산암모늄, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭사이드(DMSO), 5mM 마세트산마그네슘, 0.625mM dNTPs)을 반응 혼합물에 가하였다. 생성된 혼합물을 55°C에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 후 2.5 µl의 반응 종결 용액(95% 포름아미드, 20mM EDTA, 0.05% 브로모페놀 블루, 0.5% 크실렌 시아놀)을 반응 혼합물 5 µl에 가하였다. 혼합물을 94°C에서 3분 동안 열-변성시켰다. 1.6 µl의 각 반응 혼합물을 8% 우레아를 포함하는 6% 폴리아크릴아마이드 겔상에서 전기영동시키고 BAS2000(Fuji)를 사용하여 판독하여 프라이머 MR1으로부터 신장된 산물을 검출하였다. 결과를 도 32A에 나타낸다. 도 32A에서 열 레더는 인산화에 의해 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]으로 표지된 프라이머 MF2를 사용하여 M13mp18 싱글 스트랜드 DNA(Takara Shuzo)를 서열화하여 제조하고 신장 산물의 길이 측정을 위해 사용되었다. 레인 1: 프라이머 MF2 및 MR1; 및 레인 2: MR1.

도 32A에 나타난 바와 같이, 프라이머 MR1으로부터 주형의 말단으로 신장된 448bp의 밴드는 프라이머 MR1만을 주형에 가하여 신장 반응을 수행하였을 때 검출되었다. 한편, 추가로 프라이머 MF2를 가하여 상기 언급한 밴드 외에 프라이머 MF2 및 MR1에 결합한 373bp의 밴드를 검출하였다. 따라서, BcaBEST DNA 폴리머라제의 작용에 의해 주형으로서 PCR-증폭된 단편을 사용하여 MR1 프라이머로부터의 신장은 주형으로서 프라이머 MF2로부터 신장된 스트랜드를 사용한 신장을 변환시키는 주형에 기인하여 변환되었다는 것을 확인하였다. 또한, 동일한 조건하에서 스트랜드 치환 활성을 갖는 증온성 DNA 폴리머라제로서 Klenow DNA 폴리머라제를 사용할 때 주형 변환이 관찰되었다. 한편, Takara Taq DNA 폴리머라제(Takara Shuzo) 또는 스트랜드 치환 활성이 없는 PfuBEST DNA 폴리머라제(Takara Shuzo)를 사용할 때 주형 변환은 관찰되지 않았다.

(2) 주형 DNA 스트랜드와 그에 어닐링된 프라이머를 사용하여 주형 스위치 반응을 연구하였다. 프라이머 MF2 및 MR1이 어닐링될 수 있는 DNA 단편을 하기와 같이 제조하였다. 주형으로서 플라스미드 pUC19 및 프라이머 MCSF 및 RV (Takara Shuzo) 또는 프라이머 M4 (Takara Shuzo) 및 MCSR를 사용하여 PCR을 수행하였다. 반응 혼합물을 Microcon-100을 사용하여 정제하여 PCR-증폭된 단편: MCSF-RV (236 bp) 및 M4-MCSR (271 bp)를 수득하였다. 프라이머 M4 및 RV에 결합한 부위는 두개의 PCR-증폭된 단편에도 공통적용 존재하였다.

이후, 주형 DNA 스트랜드와 그에 어닐링되는 프라이머가 서로 어닐링하지 않은 주형-프라이머 (1), 및 형 DNA 스트랜드와 그에 어닐링되는 프라이머가 서로 어닐링된 주형-프라이머 (2)를 하기와 같이 제조하였다.

(1) 30ng의 단편 MCSF-RV, 5'-말단에 인산화에 의해 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]으로 표지된 40pmol 프라이머 MF2, 최종 농도 0.01%의 프로필렌디아민 및 5 µl까지 멸균 증류수를 포함하는 반응 혼합물, 및 30ng의 단편 M4-MCSR, 40pmol 프라이머 MR1, 최종 농도 0.01%의 프로필렌디아민 및 5 µl까지 멸균 증류수를 포함하는 반응 혼합물을 각각 98°C 2분에서 열-변성시키고 55°C로 냉각시켰다. 2.5 µl의 각 반응 혼합물을 혼합하여 주형-프라이머를 제조하였다.

(2) 15ng의 단편 MCSF-RV, 15ng의 단편 M4-MCSR, 5'-말단에 인산화에 의해 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]으로 표지된 40pmol 프라이머 MF2, 20pmol 프라이머 MR1, 최종 농도 0.01%의 프로필렌디아민 및 5 µl까지 멸균 증류수를 포함하는 반응 혼합물을 각각 98°C 2분에서 열-변성시키고 55°C로 냉각시켰다. 2.5 µl의 각 반응 혼합물을 혼

합하여 주형-프라이머를 제조하였다.

1U BcaBEST DNA 폴리머라제를 포함하는 20  $\mu$ l의 반응 혼합물(42.5mM Tricine 완충액(pH 8.7), 12.5mM 염화칼륨, 12.5mM 황산암모늄, 0.0125% 소 혈청 알부민(BSA), 1.25% 디메틸설폭시드(DMSO), 5mM 아세트산마그네슘, 0.625mM dNTPs)를 반응 혼합물에 가하였다. 생성된 혼합물을 주형-프라이머 반응 혼합물 5  $\mu$ l에 가하였다. 반응 혼합물을 55°C에서 15분동안 반응시켰다. 반응 후 2.5  $\mu$ l의 반응 종결 용액(95% 포름아미드, 20mM EDTA, 0.05% 브로모페놀 블루, 0.5% 크실렌 시아놀)을 반응 혼합물 5  $\mu$ l에 가하였다. 혼합물을 94°C에서 3분동안 열-변성시켰다. 1.6  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 8M 우레아를 포함하는 6% 폴리마크릴라이드 겔상에서 전기영동시키고 BAS2000(Fujix)를 사용하여 판독하여 프라이머 MF2로부터 신장된 산물을 검출하였다. 결과를 도 32B에 나타낸다. 도 32B에서 서열 리더는 인산화에 의해 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]으로표지된 프라이머 MR1을 사용하여 M13mp18 싱글 스트랜드 DNA(Takara Shuzo)를 서열화하여 제조하고 신장 산물의 길이를 측정하는데 사용되었다. 레인 1: 서로 어닐링되지 않은 주형 DNA 스트랜드; 및 레인 2: 서로 어닐링된 주형 DNA 스트랜드.

도 32B에 나타낸 바와 같이, 프라이머 MF2로부터 주형의 말단으로 신장된 161bp의 밴드는 주형 DNA 스트랜드와 그에 어닐링하는 프라이머가 서로 어닐링되지 않은 주형-프라이머에 대하여 검출되었다. 한편, 상기 기재한 밴드 외에도 프라이머 MF2 및 MR1에 의해 결합된 223bp의 밴드는 주형 DNA 스트랜드와 그에 어닐링하는 프라이머가 서로 어닐링된 주형-프라이머에 대하여 검출되었다. 따라서, 주형 DNA 스트랜드와 그에 어닐링하는 프라이머가 서로 어닐링된 경우 주형 스위치 반응이 발생한다는 것을 확인하였다.

### 실시예 33

(1) 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)의 검출을 참고 실시예 7에 기술된 마르키 오글루부스 플기두스(*Archaeoglobus fulgidus*) (Afu)로부터의 RNase H를 사용하여 연구하였다. 프라이머 MTIS2F (서열번호 155) 및 MTIS2R (서열번호 156)를 기탁번호 AL123456하에 GeneBank에 등록된 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 게놈의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다. 프라이머 부위를 포함하는 프라이머 쌍에 의해 인접한 부위의 길이는 103 bp였다. 통상의 방법에 따라 주형으로서 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 게놈 DNA를 건성 BCG 백신 (Nippon BCG Seizo) 으로부터 추출하였다. 1  $\mu$ l의 멸균수당 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg 또는 1 fg의 게놈 DNA를 포함하는 용액을 제조하였다. 반응을 하기과 같이 수행하였다. 간단하게, 최종 농도 32mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭시드(DMSO), 500  $\mu$ M 각 dNTPs, 50pmol의 프라이머 MTIS2R, Afu로부터의 8.75U RNase H, 8U의 BcaBEST DNA 폴리머라제 및 1  $\mu$ l의 주형중 하나를 혼합한 최종 용량을 멸균수로 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 55°C으로 세팅된 Thermal Cycler Personal상에 방치하고 60분동안 상기 온도에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% NuSieve 3:1 마가로스 겔상에서 전기영동시켰다.

한편, 대조군으로서 PCR을 수행하였다. Rinsho Byori(the Japanese Journal of Clinical Pathology), 43(9):941-947(1995))에 기술된 프라이머 MTIS PCR-F 및 MTIS PCR-R를 프라이머서 사용하였다. 276bp의 증폭 산물을 프라이머 쌍을 사용하여 수득한다. Ex Taq DNA 폴리머라제에 첨부된 안내 매뉴얼에 따라 10pmol의 각 프라이머를 사용하여 50  $\mu$ l의 반응 혼합물을 제조하였다. 반응 혼합물을 thermal cycler에 방치하고 94°C 30초, 50°C 30초 및 72°C 30초로 구성된 각 싸이클로 40싸이클, 반응 후, 반응후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 마가로스 겔상에서 전기영동시켰다.

결과, 판심의 대상이 되는 증폭 산물은 100fg의 주형을 사용하는 모든 경우에서 관찰되었다.

(2) 피로코쿠스 호리코시미(*Pyrococcus horikoshii*) (Pho)로부터의 RNase H 또는 Afu로부터의 RNase H를 사용하여 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)의 검출을 연구하였다. 프라이머 CT2F (서열번호 157) 및 CT2R (서열번호 158)를 기탁번호 X06707하에 GeneBank에 등록된 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*) 클라미디의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다. 프라이머 부위를 포함하는 프라이머 쌍에 의해 인접한 부위의 길이는 109 bp였다. 주형 DNA로서 샘플은 페널-클로로포름 처리 및 에탄올 침전에 대한 사전 동의서를 받은 환자로부터 얻은 임상검체에 의해 제조하였다. 반응을 하기과 같이 제조하였다. 간단하게, 최종 농도 32mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭시드(DMSO), 4mM 아세트산마그네슘, 500  $\mu$ M 각 dNTPs, 50pmol의 프라이머 CT2F 및 CT2R, Pho로부터 46.4U RNase H, 또는 Afu로부터 8.75U의 RNase H, 8U의 BcaBEST DNA 폴리머라제 및 1  $\mu$ l의 샘플을 혼합하여 최종 용량을 멸균수로 50  $\mu$ l로 하였다. 반응 혼합물을 55°C으로 세팅된 Thermal Cycler Personal상에 방치하고 60분동안 상기 온도에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 마가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과 판심의 대상이 되는 증폭 산물을 관찰하였다. 이 결과는 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)가 본 발명의 방법을 Afu 또는 Pho로부터 RNase H를 사용하여 관찰할 수 있음을 입증하였다.

(3) 또한, 상업적으로 이용할 수 있는 검출 장치에서 자기 비드를 사용하는 검출을 연구하였다. 간단하게 프라이머서 바이오틴으로 5'-말단에 표지된 상기(1)에서 사용된 프라이머 MTIS2R 및 주형으로서 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 게놈 DNA를 사용하여 증폭 반응을 수행하였다. 생성된 증폭 단편을 30배, 300배 또는 3000배로 희석시키고 자동 검출 장치 Lumipuls (Fujirebio)에서 스트렙토아비딘-피복된 자기 비드(Pierce)를 사용하여 검출하였다.

고정된 100pmol 바이오틴을 결합시킬 수 있는 스트렙토아비딘을 갖는 자기 비드를 쿠베트의 제 1 레이어 상에서 5분동안 바이오틴화된 증폭 단편가 반응시켰다. 이어서 0.1 N NaOH를 가하였다. FITC-표지 프로브 MTISBF와 하이드리드화를 5분동안 수행하였다. 세척후 POD-표지 항-FITC 항체를 가하였다. 5분동안 반응시키고 세척한 후, 발광 용액을 가하였다. 결과, 통상의 자동 검출 장치내에서 자기 비드를 사용하여 단시간(20분)동안 반-양적으로 검출을 수행할 수 있음을 보여준다. 광계수에 의해 발광 수준을 측정하여 검출을 수행하였다. 결과를 표 12에 나타낸다.

표 12

마이코박테리움 튜버큘로시스 ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ) 아플리콘	광계수	S/N 비
x 30	$3.55 \times 10^7$	29.6
x 300	$1.21 \times 10^7$	10.0
x 3000	$0.21 \times 10^7$	1.75
0	$0.12 \times 10^7$	-

표 12의 결과에서 검출을 통상의 플레이트 발판 방법의 것과 동일한 감수성을 수행하였음이 입증되었다.

(4) 하이브리드 크로마토그래피 방법을 상기 언급한 증폭된 단편을 검출하기 위한 방법으로 연구하였다.

스트렙토아비딘 (Nacalai Tesque)을 니트로셀룰로오스 막에 고정시켰다. 물-흡수성 패드를 얻어서 하이브리드 크로마토그래피 스티프를 작제하였다. 스티프를 사용하여 하이브리드 크로마토그래피 방법에 대한 상기 (3)에서 사용된 증폭 단편을 검출하였다. 1-단계 TMB-Biotting (Pierce)를 사용하여 발색에 의해 검출을 수행하였다. 특히 증폭 단편을 포함하는 반응 혼합물을 니트로셀룰로오스 막상에서 전개시켰다. 이후, 0.1 N NaOH 용액, FITC-표지 프로브, 세척액 및 발색 용액의 순서대로 전개시켰다. 결과, 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)-양성 샘플로부터 유래된 증폭 단편을 위해 블루 밴드를 검출하였다. 본 발명의 방법에 의해 나안으로 5 내지 10분후 결과를 본 발명으로 수득하기 때문에 본 발명은 신속 유전자 연구법으로서 유용하다고 입증되었다.

#### 실시예 34

##### (1) 리더 밴드를 포함하는 증폭 산물의 서던 하이브리드 분석

일부 경우 3개의 관심의 대상이 되는 밴드 외에 다수의 고분자 리더 밴드를 본 발명의 증폭 방법에서 관찰할 수 있다. 리더 밴드를 연구하였다. 장출혈성 E. Coli 0-157를 표적으로서 선택하였다. ICAN에 대한 반응 조건 및 키메라성 프라이머, 주형 DNA를 실시예 9에 기술하였다. 반응 후, 5 μl의 각 반응 혼합물을 3.0% NuSieve 3:1 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 37에 나타낸다. 도 37에서 레인이 하기에 대한 결과를 나타낸다. 레인 1: 100bp DNA 래더 마커; 레인 2: 1개의 세포에 상응하는 가열된 추출액; 레인 3: 10개의 세포에 상응하는 가열된 추출액; 레인 4: 100개의 세포에 상응하는 가열된 추출액; 레인 5: 1000개의 세포에 상응하는 가열된 추출액; 레인 6: 10000개의 세포에 상응하는 가열된 추출액; 및 레인 7: 100000개의 세포에 상응하는 가열된 추출액. 리더 밴드가 도 37에서와 같이 관찰되었다.

##### (2) 래더 증폭 단편의 분석

상기 (1)에서 수득한 래더 밴드의 뉴클레오타이드 서열을 분석하였다. 간단하게 (1)에서 제조된 반응 혼합물 50μl을 3% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 전기영동후 래더 밴드를 겔로부터 절단하였다. 증폭 DNA 단편을 EASYTRAP Ver.2(Takara Shuzo)를 사용하여 겔로부터 회수하였다. 회수한 증폭 단편을 DNA Blunting kit(Takara Shuzo)를 사용하여 말단을 둔화시켰다.

말단이 둔화된 DNA 단편을 DNA 겔착 키트(Takara Shuzo)를 사용하여 제한효소 HincII(Takara Shuzo)로 분해하여 벡터 pGEM-3Z (Promega)와 결합시켰다. 겔착 혼합물을 사용하여 JM109 (Takara Shuzo)의 수용능력이 있는 세포로 형질전환시켰다. 형질전환 후 세포를 발색도록 37°C에서 0.1 mM 암피실린, 1 mM IPTG 및 0.02% X-gal를 포함하는 LB 아가상에서 배양하였다.

배양 후, 수개의 백색 콜로니를 플레이트로부터 선택하였다. 콜로니 PCRs를 프라이머 M13-M4 및 M13-RV(Takara Shuzo)를 사용하여 수행하여 인서트의 존재를 확인하였다. 인서트를 갖는 콜로니를 발색도록 37°C에서 0.1 mM 암피실린을 포함하는 LB 배지에서 전탕시키면서 배양하였다. 배양 후 플라스미드를 QIAGEN 플라스미드 미니 키트(Qiagen)를 사용하여 세포로부터 정제하였다. 플라스미드의 HincII 사이트에 서 절단된 단편 서열을 통상의 방법에 따라 프라이머 M13-M4 및 M13-RV를 사용하여 양 방향으로 분석하였다.

결과, 본 발명의 방법에 의해 수득된 래더 단편은 증폭시키고자 하는 부위가 반복된 구조를 갖는다고 입증되었다. 또한, 반복은 5'로부터 3'으로 동일한 방향임을 확인하였다.

(3) 본 발명의 방법에서 형성된 관심의 대상이 되는 3개의 증폭 단편 외에 래더 증폭 단편을 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), HCV 또는 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)에 대하여 연구하였다. 실시예 31에 기술된 바와 같은 조건하에 HCV를 검출하였다. 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 또는 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)를 실시예 33에 기술된 바와 같은 조건하에 검출하였다. 생성된 래더 증폭 단편을 상기 (2)에 기술된 바와 같이 서브클로닝하고 서열화하였다.

결과, 본 발명의 방법에 의해 수득된 래더 단편은 증폭시키고자 하는 부위가 반복된 구조를 갖는다고 입증되었다. 또한, 반복은 5'로부터 3'으로 동일한 방향임을 확인하였다.

#### 실시예 35

(1) 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)에 대하여 본 발명의 검출방법을 연구하였다. 먼저, 프라이머 K-F-1033(60) (서열번호 159) 및 K-F-1133(62) (서열번호 160)를 마이코박테리움 튜

버큐로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 게놈 중 상대적으로 낮은 GC 함량을 갖는 부위를 증폭시키기 위하여 합성하였다. 실시예 33(1)에 기술된 바와 같은 100 fg 내지 10pg의 마이코박테리움 튜버큐로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 게놈 DNA를 포함하는 일련의 희석액을 주형으로서 사용하였다. 반응을 하기와 같이 수행하였다. 간단하게, 최종 농도 32mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭시드(DMSO), 4mM 아세트산마그네슘, 500  $\mu$ M 각 dNTPs, 50pmol의 프라이머 K-F-1033 및 K-F-1133(62), Pfu로부터의 9.735U의 RNase H 또는 Afu로부터의 4.375U의 RNase H, 2.75U의 BcaBEST DNA 폴리머라제 및 1  $\mu$ l의 주형 중 하나를 샘플을 혼합하여 최종 용량을 멸균수로 25  $\mu$ l 으로 하였다. 반응 혼합물을 55°C로 세팅된 Thermal Cycler Personal 상에 방치하고 60분동안 상기 온도에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 겔과 주형으로서 100 fg 내지 10pg의 게놈 DNA 및 RNase H를 사용하여 증폭 단편을 검출할 수 있음을 확인하였다.

(2) 상기 (1)에 기술된 방법을 높은 Tm값을 갖는 프라이머를 사용하여 연구하였다. 우선, 프라이머 K-F-1033(68) (서열번호 161) 및 K-F-1133(68) (서열번호 162)를 합성하였다. 반응 온도가 63°C인 것을 제외 한 (1)에 기재된 바와 동일한 조건하에서 증폭 반응을 수행하였다. 반응 후 3  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켰다. 결과를 도 38에 나타낸다. 도 38은 Pfu로부터의 RNase H 또는 Afu로부터의 RNase H를 사용하여 증폭된 마이코박테리움 튜버큐로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 게놈의 전기영동 결과를 보여준다. 레인 1 내지 4는 Pfu로부터의 RNase H를 사용하여 수득한 결과를 나타내고 주형 DNA의 양은 하기와 같다: 레인 1: 10pg; 레인 2: 1pg; 레인 3: 100fg; 레인 4: 음성 대조군. 레인 5 내지 8은 Afu로부터의 RNase H를 사용하여 수득한 결과를 나타내고 주형 DNA의 양은 하기와 같다: 레인 5 10pg; 레인 6: 1 pg; 레인 7: 100 fg; 및 레인 8: 음성 대조군. 레인 M은 100 bp DNA 리더 마커를 나타낸다.

도 38에 나타난 바와 같이 100fg의 주형 DNA 및 RNase H를 사용하여 관심의 대상이 되는 증폭 단편을 검출할 수 있다는 것이 입증되었다. Afu로부터의 RNase H를 사용하였을 때 더욱 많은 증폭 산물을 수득된 것을 나타냈다. 또한, Afu로부터의 RNase H를 사용하였을 때 더욱 안정적인 검출 감수성이 달성되었다는 것이 나타났다.

(3) 프라이머 K-F-1033(68) 및 K-F-1133(68)의 결합을 및 주형으로서 증폭시키고자 하는 부위를 포함하는 플라스미드를 사용하는 증폭을 연구하였다. 우선, 프라이머 F26 (서열번호 163) 및 R1310 (서열번호 164)를 순서대로 합성하여 증폭시키고자 하는 부위를 포함하는 플라스미드를 제조하였다. 프라이머 및 BcaBEST DNA 폴리머라제를 사용하여 PCR을 수행하였다. 이후 생성된 증폭 산물을 pT7-Blue-T 벡터 (Takara Shuzo)내로 삽입하여 플라스미드를 제조하였다. 반응 혼합물의 조성은 4 U의 BcaBEST DNA 폴리머라제를 사용한 것을 제외 한 상기 (2)와 동일하였다. 결과, 1fg의 주형을 사용하여 검출할 수 있다는 것을 확인하였다.

(4) 관심의 대상이 되는 3개의 증폭 단편을 포함하는 래더 증폭 단편을 형성시키는 프라이머 MTIS2F 및 MTIS2R의 결합을 사용할 때 얻은 검출 감수성은 관심의 대상이 되는 3개의 증폭 단편을 얻는 프라이머 K-F-1033(68) 및 K-F-1133(68)의 결합을 사용할 때 얻은 것과 비교하였다. 마이코박테리움 튜버큐로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)를 표적으로서 사용하였다. 프라이머 MTIS2F 및 MTIS2R의 결합을 사용하는 경우 실시예 33(2)에서와 같이 반응을 수행하거나 프라이머 K-F-1033(68) 및 K-F-1133(68)의 결합을 사용하는 경우 상기 (2)에서와 같이 반응을 수행하였다. 결과, 동일한 검출 결과가 모든 경우에서 관찰되었다.

#### 실시예 36

주형으로서 게놈 DNA의 변성을 포함하지 않는 본 발명의 증폭 방법을 연구하였다.

(1) 플라스미드 pDON-AI (Takara Shuzo)중 패키징 부위의 뉴클레오타이드 서열에 따라 프라이머 pDON-AI-68-1 (서열번호 165) 및 pDON-AI-68-2 (서열번호 166)를 합성하였다.

(2) 10fg 또는 1pg의 pDON-AI를 포함하는 1  $\mu$ l 용액, 실시예 23에서 제조된 삽입된 pDON-AI를 갖는 NIH/3T3 세포로부터 유래된 게놈 DNA 1ng, 10ng, 또는 100ng를 포함하는 1  $\mu$ l 용액, 또는 음성 대조군으로서 1  $\mu$ l의 물, 상기 (1)에 기술된 50pmol의 각 프라이머, 0.5mM dNTPs, 32mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 100mM 아세트산칼륨, 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭시드(DMSO), 4mM 아세트산마그네슘, Pfu로부터의 18.5U의 RNase H 및 4U의 BcaBEST DNA 폴리머라제 를 포함하는 총 용량 50  $\mu$ l의 반응 혼합물을 제조하였다. 반응 혼합물을 Thermal Cycler에 넣고 1시간동안 64°C에서 인큐베이션시켰다. 반응후, 5  $\mu$ l의 각 반응 혼합물을 3.0% 아가로스 겔상에서 전기영동시켜 증폭 산물을 관찰하였다. 결과를 도 39에 나타낸다. 도 39에서 레인은 하기 주형에 대한 결과를 나타낸다: 레인 M: 100bp DNA 리더 마커; 레인 1: 음성 대조군; 레인 2: 삽입된 pDNA-AI DNA를 갖는 1ng의 게놈 DNA; 레인 3: 삽입된 pDNA-AI DNA를 갖는 10ng의 게놈 DNA; 레인 4: 삽입된 pDNA-AI DNA를 갖는 100ng의 게놈 DNA; 레인 5: 10fg의 pDNA-AI DNA; 및 레인 6: 1ng의 pDNA-AI DNA.

도 39에 나타난 바와 같이, 특정 DNA 단편의 증폭은 pDON-AI 또는 삽입된 pDNA-AI DNA를 갖는 게놈 DNA에 대하여 관찰되었다. 따라서 게놈 DNA를 주형으로서 사용하는 경우에서 반응 전 주형으로서 DNA를 변성시키지 않고 관심의 대상이 되는 DNA 단편을 증폭시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

#### 실시예 37

본 발명의 적합도(정확도)를 TaKaRa Ex Taq 폴리머라제 (Takara Shuzo)가 사용된 LA 기술을 사용하는 PCR의 것과 비교하였다. 우선, 주형으로서 플라스미드를 하기와 같이 제조하였다

특히, 서열번호 167 내지 170로 나타낸 300bp로 구성된 각 부위를 인간 프로토-온코진, Wnt-5a 유전자 (GenBank 기탁번호 L20861), 리보솜 단백질 S5 유전자 (GenBank 기탁번호 XM\_009371), 인간 NADH 유전자 (GenBank 기탁번호 NM\_000903) 및 인간 프로토카드헤린 43 유전자 (GenBank 기탁번호 AU077347)으로부터 PCR에 의해 증폭시켰다. 이 경우, 프라이머의 5' 말단에 제한효소 SfiI에 대한 사이트를 갖는 특정 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 반응 후 증폭 단편을 제한효소 SfiI (Takara Shuzo)로 분해하였다.

pUC19 (Takara Shuzo)를 제한효소 *Sfi* I (NEB) 및 *Nde* I (Takara Shuzo)로 분해하고 아가로스 겔 전기영동시켰다. 약 2kbp의 단편을 겔로부터 절단하고 EASYTRAP (Takara Shuzo)를 사용하여 회수하였다. 서열번호 171의 서열을 갖는 DNA 및 그에 상보적인 DNA를 DNA 합성기를 사용하여 합성하였다. 이들 DNA를 열-변형시키고 서로 어닐링하여 더블-스트랜드 DNA를 형성하였다. 이 더블-스트랜드 DNA는 그의 말단에 제한효소 *Sfi* I 및 *Nde* I에 대한 응집성 말단을 갖는다. 더블-스트랜드 합성 DNA를 DNA Ligation kit ver. 2 (Takara Shuzo)를 사용하여 pUC19를 제한효소로 분해하여 수득한 단편내로 삽입하였다. 생성된 플라스미드를 pIC62로 명명하였다. pIC62는 프라이머 ICAN2 (서열번호 172) 및 ICAN6 (서열번호 173)가 어닐링하는 서열 및 제한 효소 *Sfi* I에 대한 사이트를 갖는다. 플라스미드 pIC62를 제한효소 *Sfi* I로 분해하였다. 제한효소 *Sfi* I로 분해된 상기 언급한 PCR-증폭된 단편을 Ligation kit ver. 2 (Takara Shuzo)를 사용하여 플라스미드와 결합시켰다. 결합 혼합물을 사용하여 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) JM109 (Takara Shuzo)를 형질전환시켰다. 생성된 형질전환체를 배양하고, 삽입되는 약 300bp DNA를 갖는 플라스미드를 수득하고 삽입된 DNA의 서열을 동정하였다. 플라스미드를 실시예에서 주형으로서 사용하였다.

(2) ICAN 증폭 산물을 하기와 같이 제조하였다. 간단하게, 주형으로서 10ng의 플라스미드 중 하나, 50pmol의 각 키메라성 프라이머 ICAN2(서열번호 172) 및 ICAN6(서열번호 173) 및 0.01% 프로필렌디아민을 포함하는 10 µl의 용액을 제조하였다. 용액을 Thermal Cycler Personal에서 98°C에서 2분동안 가열시키고 1시간동안 60°C에서 인큐베이션시키고 열용상에 이동시켰다. 이후 최종 농도 20mM HEPES-수산화칼륨(pH 7.8), 100mM 마세트산칼륨, 0.01% 소 혈청 알부민(BSA), 1% 디메틸설폭사이드(DMSO), 4mM 아세트산마그네슘, 500 µM 각 dNTPs, 30U E.Coli. RNase H, 및 5.5U의 BcaBEST DNA 폴리머라제를 가하여 최종 용량을 50 µl로 하였다. 반응 혼합물을 60°C으로 세팅된 Thermal Cycler Personal에 배치하고 60분동안 상기 온도에서 인큐베이션시켰다. 반응 후, 반응 혼합물을 2.0% SeaKem GTG 아가로스 겔 (Takara Shuzo)상에서 전기영동시켰다. 전기영동 후 관심의 대상이 되는 증폭 산물에 대한 밴드를 아가로스 겔로부터 절단, SUPREC-01 (Takara Shuzo)를 사용하여 회수, 페놀-클로로포름을 처리 및 에탄올을 침전하여 회수하였다.

(3) PCR 증폭 산물 TaKaRa Ex Taq DNA 폴리머라제를 사용하여 하기와 같이 제조하였다. 간단하게 주형으로서 10ng의 상기 언급한 플라스미드 및 10 pmol의 각 DNA 프라이머 ICAN2 (서열번호 174) 및 ICAN6 (서열번호 175)를 사용하여 TaKaRa Ex Taq DNA 폴리머라제 (Takara Shuzo)에 첨부된 안내 매뉴얼에 따라 반응 혼합물을 제조하였다. 반응 혼합물을 Thermal Cycler에 넣고 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 및 72°C에서 30초로 30사이클로 반응시켰다. 반응 후 반응 혼합물을 상기 (2)에 기술된 바와 같이 아가로스 겔 전기영동시켰다. 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 Microcon-100 (Takara Shuzo)를 사용하여 회수, 페놀-클로로포름을 처리 및 에탄올을 침전하여 회수하였다.

(4) 상기 (2) 및 (3)에서 수득한 증폭 산물을 하기와 같이 서브클로닝하였다. 안내 매뉴얼에 따라 ICAN 증폭 산물 및 PCR 증폭 산물을 Perfectly Blunt Cloning kit (Takara Shuzo)를 사용하여 벡터 pT7 Blue (Takara Shuzo)내로 삽입하였다. 결합 혼합물을 사용하여 NovaBlue Singles Competent Cell (Takara Shuzo)를 형질전환시켰다. 각 클론에 대하여 10개의 콜로니를 각 생성된 형질전환체로부터 선별하고 배양하여 약 0.4-kb의 삽입 DNA를 갖는 플라스미드를 수득하였다. 플라스미드에 삽입된 단편을 T7 프로모터 프라이머 (Takara Shuzo) 및 M3 프라이머 (Takara Shuzo)를 사용하여 서열화하였다.

총 약 16,000 염기를 상기 기재된 바와 같이 서열화하여 분석하였다. 결과, 하나의 염연변이가 본 발명의 방법에 따라 증폭된 단편 및 TaKaRa Ex Taq DNA 폴리머라제를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 단편 모두에 대하여 2500 염기에서 발견되었다. 따라서 본 발명의 방법의 적합도(정확도)가 높은 LA-PCR의 것과 동일하다는 것이 입증되었다.

#### 실시예 38

##### (1) PCR에 의한 ICAN 반응을 위한 주형의 제조

더블-스트랜드 cDNA를 cDNA 합성 키트(Takara Shuzo)를 사용하여 마우스 뇌 (Origene)로부터 유래된 polyA<sup>+</sup> RNA로부터 제조하였다. 주형으로서 더블-스트랜드 cDNA 및 서열번호176-189의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머의 결합물을 사용하여 PCR 단편을 증폭시켰다. 단편을 TA 클로닝에 의해 pT7 Blue T-벡터 (Takara Shuzo)내로 삽입하여 플라스미드 클론을 수득하였다. 1 µl (1ng)의 플라스미드 클론, 10pmol의 각 프라이머 MCS-F(서열번호 190) 및 MCS-R(서열번호 191), 1.25U의 Ex Taq(Takara Shuzo), 5 µl의 10 x Ex Taq 완충액 (Takara Shuzo) 및 0.2mM 각 dNTPs를 포함하는 총 50 µl의 반응 혼합물을 Takara PCR Thermal Cycler Personal을 사용하여 하기와 같이 반응시켰다: 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 및 72°C에서 1분동안 30사이클. 생성된 증폭 DNA 단편을 ICAN 반응을 위한 주형으로서 사용하였다.

##### (2) 주형으로서 PCR 산물을 사용하여 ICAN에 의해 DNA 단편 증폭

ICAN 반응을 아미노알릴 dUPT(Sigma)를 사용하여 수행하여 아미노 그룹을 ICAN 증폭 산물에 삽입시켰다. ICAN 증폭 산물에 삽입되는 아미노 그룹의 비를 하기와 같은 ICAN 반응중 아미노알릴 dUPT의 양에 대한 dTTP의 양의 비를 변형하여 연구하였다: 10 : 0, 9 : 1, 8 : 2, 7 : 3 및 6 : 4. 반응을 하기와 같이 수행하였다.

우선, 상기 (1)에서 제조된 1 µl의 PCR 반응 혼합물, 50pmol의 각 프라이머 F2N3(24)(서열번호 192) 및 MRIN3(24)(서열번호 193) 및 2 µl의 0.05% 프로필렌디아민 수용액을 포함하는 총 용량 10 µl의 용액을 98°C에서 2분, 이어서 65°C에서 30초동안 Takara PCR Thermal Cycler Personal에서 가열된 금속 냉각시켜 프라이머가 주형에 어닐링되도록 하였다. 0.625mM 각 dATP, dCTP 및 dGTP, 0.625mM dTTP + Aminoallyl dUPT 혼합물, 32mM HEPES-수산화칼륨 완충액(pH 7.8), 5mM 아세트산마그네슘, 0.6U의 RNase H(Takara Shuzo) 및 2.75U BcaBEST DNA 폴리머라제를 포함하는 총 용량 40 µl의 반응 혼합물을 가열된 용액에 가하였다. 반응 혼합물을 1시간동안 65°C에서 Thermal Cycler에서 인큐베이션시켰다.

50 µl의 이소프로판올 및 3 µl의 3M 아세트산나트륨 용액(pH 5.2)를 반응 혼합물 50 µl에 가하였다. 반응 혼합물을 20분동안 -80°C에서 냉각시키고 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 200 µl의 70% 에탄올 용액을 가하였다. 상층액을 원심분리에 의해 제거하였다. 침전물을 공기 건조시켰다. 생성된 DNA를 물에 재용

해시켰다.  $OD_{260}$ 를 측정하여 생성물의 양을 확인하였다.

### (3) 아미노알릴 dUTP의 ICAN 증폭 산물로의 삽입 확인

아미노 그룹의 ICAN 산물로의 삽입을 ICAN 산물중 형광-표지 아미노 그룹에서 5-카복시플루오레세인 속신이 미틸 에스테르 (Molecular Probe)를 사용하여 확인하였다. 상기 언급한 DNA 용액을 희석하여 농도를  $2 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ 로 하였다.  $10 \mu\text{l}$ 의  $1\text{M}$  탄산나트륨 (pH 9.0)을 가하였다. 이후, N,N-디메틸포름아미드중  $4 \mu\text{l}$ 의  $10\text{mM}$  FITC(Nacalai Tesque) 용액을 가하였다. 삽입적용 이용가능한 스피프 합법을 사용하여 과량의 FITC를 제거한 후,  $10 \mu\text{l}$ 의 반응 혼합물을  $2.0\%$  아가로스 겔상에 적용하고 전기영동시켰다. 전기영동시킨 후, 형광 염료를 FM-B10를 사용하여 검출하였다. 또한 ICAN-증폭 단편을 EtBr로 염색하여 검출하였다. 결과 아미노알릴 dUTP를 사용하여 ICAN을 수행하여 아미노 그룹이 ICAN 증폭 산물내 삽입될 수 있음을 확인하였다. 또한 배합물로 증폭 산물에 대한 형광 표지 및 작용 그룹을 갖는 변형된 뉴클레오타이드를 사용하여 검출 감수성이 증가될 수 있음을 확인하였다.

(4) 본 발명의 증폭 방법을: 대옥시UTP를 사용하여 연구하였다. 마이코박테리움 튜버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*)를 표적으로서 선택하였다. 우선, 프라이머 MTIS2F-16 (서열번호 194) 및 MTIS2R-ACC (서열번호 195)를 기탁번호 AL123456에 GenBank에 등록된 마이코박테리움 튜버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 게놈의 뉴클레오타이드 서열에 기초하여 합성하였다. 프라이머 부위를 포함하는 증폭되는 부위의 길이는  $98 \text{ bp}$ 이다. 주형을 하기와 같이 제조하였다. 간단하게 프라이머 MTIS-PCR-F-2 (서열번호 196) 및 MTIS-PCR-R-2 (서열번호 197)를 사용하여 마이코박테리움 튜버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 게놈을 PCR-증폭하여 수득된 산물을 pT7 Blue T-벡터 (Takara Shuzo)내로 DNA Ligation kit Ver. 2를 사용하여 삽입하였다. 결합된 플라스미드를 사용하여 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) JM109를 형질전환시켰다. 생성된 형질전환체를 배양하여 삽입되는 약  $400\text{p}$ 를 갖는 플라스미드를 수득하였다.  $1 \mu\text{l}$ 의 플라스미드당  $1000$ 개의 카피를 포함하는 용액을  $OD_{260}$ 를 측정하여 확인된 농도에 기초하여 제조하였다.

최종 농도  $32\text{mM}$  HEPES-수산화칼륨 (pH 7.8),  $100\text{mM}$  아세트산칼륨,  $0.01\%$  소 혈청 알부민 (BSA),  $1\%$  디메틸 설폭시드 (DMSO),  $4\text{mM}$  아세트산마그네슘,  $500 \mu\text{M}$  각 dATP, dCTP 및 dGTP, dTTP/dUTP 혼합물 ( $500/0$ ,  $400/100$ ,  $300/200$ ,  $200/300$ ,  $100/400$  또는  $0/500 \mu\text{M}$ ),  $50\text{pmol}$  각 프라이머 MTIS 2F-16 및 MTIS 2R-AAC, Afu로부터의  $8.75\text{U}$ 의 RNase H,  $8\text{U}$ 의 BcaBEST DNA 폴리머라제 및  $1 \mu\text{l}$ 의 주형 ( $1000$ 개의 카피)를 혼합하여 최종 용량을 멸균수로  $50 \mu\text{l}$ 으로 하였다. 반응 혼합물을  $60^\circ\text{C}$ 으로 세팅된 Thermal Cycler Personal상에 방치하고  $60$ 분동안 인큐베이션시켰다. 반응 후,  $3 \mu\text{l}$ 의 각 반응 혼합물을  $3\%$  아가로스 겔 상에서 전기영동시켰다.

결과 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 각 dTTP/dUTP 비에 대하여 관찰하였다. 이 결과에 기초하여 변형된 뉴클레오타이드를 기질로서 본 발명의 방법에서 사용할 수 있음을 확인하였다.

### 실시예 39

본 발명의 방법을 1단계 증폭 방법으로 적용하는 것을 연구하였다. HCV를 표적으로서 선택하였다.

#### (1) 트랜스크립트 RNA 제조

주형으로서 트랜스크립트 RNA를 제조하였다. 시약에 첨부된 안내서에 따라 TRIzol 시약 (Life Technologies)를 사용하여 사전 동의서에 동의한 C형 간염 바이러스를 갖는 환자로부터 유래된  $300 \mu\text{l}$ 의 혈청으로부터 제조하고 연속하여  $20 \mu\text{l}$ 의 주사 용수 (Otsuka Pharmaceutical)로 최종 희석하였다. RT-PCR을 상기 RNA 주형을 주형으로서 사용하여 수행하였다. 1단계 RNA PCR 키트 (Takara Shuzo)에 첨부된 매뉴얼에 따라  $2 \mu\text{l}$ 의 RNA 샘플 및  $20\text{pmol}$ 의 각 프라이머 SP6-HCV (서열번호 198) 및 T7-HCV-R (서열번호 199)를 사용하여  $50 \mu\text{l}$ 의 반응 혼합물을 제조하였다. 반응 혼합물을 Thermal Cycler Personal상에 방치하고 하기와 같이 반응시켰다:  $50^\circ\text{C}$ 에서  $15$ 분;  $94^\circ\text{C}$ 에서  $2$ 분; 및  $94^\circ\text{C}$ 에서  $30$ 초;  $60^\circ\text{C}$ 에서  $30$ 초 및  $72^\circ\text{C}$ 에서  $30$ 초에서  $40$  사이클. 반응 후, 반응 혼합물을  $2\%$  SeaPlaque GTG 아가로스겔 상에서 전기영동시켰다. 관심의 대상이 되는  $350\text{bp}$  증폭 산물을 겔로부터 절단하였다. DNA를 키트에 첨부된 안내서에 따라 EASYTRAP Ver. 2에 따라 회수하였다. 트랜스크립트 RNA를 주형으로서 회수된 DNA 및 Competitive RNA 전시 키트 (Takara Shuzo)를 사용하여 키트에 첨부된 안내서에 따라 합성하였다. 트랜스크립트 RNA를 주형으로 사용하여 1단계 RT-ICAN 연구하였다.

#### (2) 1단계 RT-ICAN 연구

상기 (2)에서 제조된 트랜스크립트 RNA의 농도를  $OD_{260}$  값에 기초하여 측정하고  $1 \mu\text{l}$ 당  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  또는  $10^7$ 을 포함하는 희석액을 제조하였다. 최종 농도  $32\text{mM}$  HEPES-수산화칼륨 (pH 7.8),  $100\text{mM}$  아세트산칼륨,  $0.01\%$  소 혈청 알부민 (BSA),  $1\%$  디메틸설폭시드 (DMSO),  $4\text{mM}$  아세트산마그네슘,  $500 \mu\text{M}$  각 dNTPs,  $50\text{pmol}$  각 프라이머 HCV-A S (서열번호 200) 및 HCV-A A (서열번호 201), Pfu로부터의  $30\text{U}$  RNase H,  $8\text{U}$ 의 BcaBEST DNA 폴리머라제,  $20\text{U}$  RNase 저해제,  $0$ ,  $1$ ,  $2.5$ ,  $3$  또는  $5\text{U}$ 의 AMV RTase XL (Takara Shuzo) 및 다양한 카피 수의 트랜스크립트 RNA를 포함하는 희석액중 하나  $1 \mu\text{l}$ 를 포함하는  $50 \mu\text{l}$ 의 반응 혼합물을 제조하였다. 반응 혼합물을  $60^\circ\text{C}$ 으로 세팅된 Thermal Cycler Personal상에 방치하고  $60$ 분동안 인큐베이션시켰다. 반응 후,  $2 \mu\text{l}$ 의 각 반응 혼합물을  $3\%$  아가로스 겔 상에서 전기영동시켰다.

결과 AMV RTase XL을 첨가하지 않은 경우 각 주형의 희석액의 사용으로 관심의 대상이 되는 증폭산물은 관찰되지 않았다. 한편,  $10^7$  카피 ( $1\text{U}$ 의 AMV RTase XL 첨가),  $10^6$  카피 ( $2.5\text{U}$ 의 AMV RTase XL 첨가);  $10^5$  카피 ( $3\text{U}$ 의 AMV RTase XL 첨가) 또는  $10^4$  ( $5\text{U}$ 의 AMV RTase XL 첨가)를 사용하여 관심의 대상이 되는 증폭 산물을 관찰하였다. 반응을  $57^\circ\text{C}$ 에서 수행한 경우  $10^6$  카피를 포함하는 희석액 및  $2.5\text{U}$ 의 AMV RTase XL의 사용으로 관심의 대상이 되는 증폭산물은 관찰하였다. 또한  $1\text{U}$ 의 BcaBEST DNA 폴리머라제 및  $10\text{U}$  Pfu로부터의 RNase H를 사용하였을 때 AMV RTase를 첨가한 경우에도  $10^6$  카피를 포함하는 희석액의 사용으로 관심의

대상이 되는 증폭 산물을 관찰하였다.

#### 산인성이용가능성

본 발명은 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 DNA 합성 반응에 의해 표적 핵산의 뉴클레오타이드 서열에서 특정 증폭에 적절한 부위를 증폭시키는 것을 포함하는 표적 핵산 증폭시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 표적 핵산을 증폭시켜 수득한 표적 핵산으로부터 증폭된 단편을 검출하는 것을 포함하는 표적 핵산 검출 방법을 제공한다. 또한 본 발명의 증폭 방법은 핵산을 증폭시키는 또다른 방법 또는 핵산을 복제하는 방법과 결합하여 핵산을 생산하는 효과적인 방법에 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 고도의 감수성으로 미생물 특히, 바이러스, 박테리움, 진균, 효모 등의 특정 검출 및 측량을 위한 표적 핵산 및 상기 방법을 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 소량의 핵산을 검출하고 증폭시키는 자동화되고 고도로 통합된 시스템을 제공한다.

#### 서열 목록

서열번호 1: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 BsuII-3.

서열번호 2: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 BsuII-6.

서열번호 3: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 RNII-S1.

서열번호 4: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 RNII-S2.

서열번호 5: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 RNII-S5.

서열번호 6: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 RNII-S6.

서열번호 7: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 RNII-Nde.

서열번호 8: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 유전자중 ORF의 뉴클레오타이드 서열.

서열번호 9: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 아미노산 서열.

서열번호 10: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 BsuIII-1.

서열번호 11: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 BsuIII-3.

서열번호 12: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 BsuIII-6.

서열번호 13: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 BsuIII-8.

서열번호 14: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 RNIII-S3.

서열번호 15: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 BcaRNIII-3.

서열번호 16: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII중 ORF의 뉴클레오타이드 서열.

서열번호 17: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 아미노산 서열.

서열번호 18: 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 증폭시키기 위한 PCR 프라이머 BcaRNIII-Nde.

서열번호 19: PH1650 및 일부의 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 게놈 서열 사이에 보존되는 뉴클레오타이드 서열.

서열번호 20: 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 1650Nde.

서열번호 21: 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 1650Bam.

서열번호 22: 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*)로부터 RNaseHII중 ORF의 뉴클레오타이드 서열.

서열번호 23: 피로코쿠스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*)로부터 RNaseHII의 아미노산 서열.

서열번호 24: 새모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하는 PCR 프라이머 915-F1.



- 서열번호 25: 썬모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*)로부터 RNaseHII 합성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하는 PCR 프라이머 915-F2.
- 서열번호 26: 썬모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*)로부터 RNaseHII 합성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하는 PCR 프라이머 915-R1.
- 서열번호 27: 썬모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*)로부터 RNaseHII 합성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하는 PCR 프라이머 915-R2.
- 서열번호 28: 플라스미드 pUC19의 일부를 증폭시키기 위한 pUC19 상부 150으로 명명되는 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 24 내지 25는 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 29: 플라스미드 pUC19의 일부를 증폭시키기 위한 MR1N3으로 명명되는 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 28 내지 30은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 30: M13M4로 명명된 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 31: 출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157로부터 베로독소 1-코딩 서열의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 16내지 18은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 32: 출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157로부터 베로독소 1-코딩 서열의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 15내지 17은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 33: 출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157로부터 베로독소 2-코딩 서열의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 16내지 18은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 34: 출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157로부터 베로독소 2-코딩 서열의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 16내지 18은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 35: 긴 DNA 단편을 증폭시키기 위한 MCR-F으로 명명되는 작제된 올리고 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 36: 긴 DNA 단편을 증폭시키기 위한 MCR-R으로 명명된 작제된 올리고 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 37: 긴 DNA 단편을 증폭시키기 위한 MF2N3(24)로 명명된 작제된 올리고 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 22내지 24는 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 38: 긴 DNA 단편을 증폭시키기 위한 MR1N3(24)로 명명된 작제된 올리고 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 22내지 24는 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 39: 람다 DNA의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 18내지 20은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 40: 람다 DNA의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 18내지 20은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 41: 람다 DNA의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 42: 람다 DNA의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 43: 플라보박테리움(*Flavobacterium*) 종 DNA의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 18내지 20은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 44: 플라보박테리움(*Flavobacterium*) 종 DNA의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 18내지 20은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 45: 플라보박테리움(*Flavobacterium*) 종 DNA의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 46: 플라보박테리움(*Flavobacterium*) 종 DNA의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 47: 출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157로부터 베로독소 2-코딩 서열의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 19 내지 21은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'
- 서열번호 48: 출혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157로부터 베로독소 2-코딩 서열의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 18 내지 20은 리보뉴클레오타이드이고, 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'

•

;

[illegible]

클레오티드이고 다른 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

서열번호 131: 종혈성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 0-157로부터 베토크소 1-코딩 서열의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머. 뉴클레오티드 18 내지 20은 리보뉴클레오티드이고 다른 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

서열번호 132: 마우스로부터 iNOS-코딩 서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머.

서열번호 133: 마우스로부터 iNOS-코딩 서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머.

서열번호 134: pUC19 상부 150로 명명된 플라스미드 pUC19 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오티드 프라이머.

서열번호 135: pUC19 하부 NN로 명명된 플라스미드 pUC19 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오티드 프라이머.

서열번호 136: SEA-1로 명명된 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머. 뉴클레오티드 19 내지 21은 리보뉴클레오티드이고 다른 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

서열번호 137: SEA-2로 명명된 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머. 뉴클레오티드 19 내지 21은 리보뉴클레오티드이고 다른 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

서열번호 138: HCV-F3로 명명된 HCV 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머. 뉴클레오티드 17 내지 19은 리보뉴클레오티드이고 다른 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

서열번호 139: HCV-R1로 명명된 HCV 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머. 뉴클레오티드 16 내지 18은 리보뉴클레오티드이고 다른 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

서열번호 140: MF2로 명명된 pUC19 플라스미드 DNA일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머.

서열번호 141: MR1로 명명된 pUC19 플라스미드 DNA일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머.

서열번호 142: 아데노바이러스 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머.

서열번호 143: 씨모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*)로부터 RNaseHII 유전자중 ORF의 뉴클레오티드 서열.

서열번호 144: 씨모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*)로부터 RNaseHII의 아미노산 서열.

서열번호 145: 피로코쿠스 호리코시이(*Pyrococcus horikoshii*)로부터 PH1650의 뉴클레오티드 서열.

서열번호 146: 피로코쿠스 호리코시이(*Pyrococcus horikoshii*) PCR 프라이머 PhoNde.

서열번호 147: 피로코쿠스 호리코시이(*Pyrococcus horikoshii*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 PhoBam.

서열번호 148: 피로코쿠스 호리코시이(*Pyrococcus horikoshii*)로부터 RNaseHII 유전자중 ORF의 뉴클레오티드 서열.

서열번호 149: 피로코쿠스 호리코시이(*Pyrococcus horikoshii*)로부터 RNaseHII의 아미노산 서열.

서열번호 150: 아르키오글루부스 플기두스(*Aerhaeoglobus fulgidus*)로부터 AF0621의 뉴클레오티드 서열.

서열번호 151: 아르키오글루부스 플기두스(*Aerhaeoglobus fulgidus*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 AfuBam.

서열번호 152: 아르키오글루부스 플기두스(*Aerhaeoglobus fulgidus*)로부터 RNaseHII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머 AfuBam.

서열번호 153: 아르키오글루부스 플기두스(*Aerhaeoglobus fulgidus*)로부터 RNaseHII 유전자중 ORF의 뉴클레오티드 서열.

서열번호 154: 아르키오글루부스 플기두스(*Aerhaeoglobus fulgidus*)로부터 RNase HII의 아미노산 서열.

서열번호 155: MT1S2F로 명명되는 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머. 뉴클레오티드 16 내지 18은 리보뉴클레오티드이고 다른 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

서열번호 156: MT1S2R로 명명되는 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머. 뉴클레오티드 19 내지 21은 리보뉴클레오티드이고 다른 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

서열번호 157: CT2F로 명명되는 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*) 잠적플라스미드 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머. 뉴클레오티드 19 내지 21은 리보뉴클레오티드이고 다른 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다.

서열번호 158: CT2R로 명명되는 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*) 잠적플라스미드 일부를

- 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 16 내지 18은 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.
- 서열번호 159: K-F-1033(60)로 명명되는 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 17 내지 19는 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.
- 서열번호 160: K-R-1133(62)로 명명되는 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 18 내지 20은 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.
- 서열번호 161: K-F-1033(68)로 명명되는 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 20 내지 22는 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.
- 서열번호 162: K-R-1133(68)로 명명되는 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 20 내지 22는 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.
- 서열번호 163: F26로 명명되는 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 164: R1310로 명명되는 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 165: pDON-A1-68-1로 명명되는 pDON-A1 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 20 내지 22는 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.
- 서열번호 166: pDON-A1-68-2로 명명되는 pDON-A1 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 21 내지 23는 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.
- 서열번호 167: 호모 사피엔스 (*Homo sapiens*) 프로토-온코진 Wnt-5a의 뉴클레오타이드 서열
- 서열번호 168: 호모 사피엔스 (*Homo sapiens*) 리보솜 단백질 S5의 뉴클레오타이드 서열
- 서열번호 169: 호모 사피엔스 (*Homo sapiens*) 디아포라제의 뉴클레오타이드 서열
- 서열번호 170: 인간 프로토카드헤린의 뉴클레오타이드 서열
- 서열번호 171: pIC62를 작제하기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드.
- 서열번호 172: ICAN2로 명명된 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 19 내지 20는 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.
- 서열번호 173: ICAN6로 명명된 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 19 내지 20는 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.
- 서열번호 174: ICAN2 DNA로 명명된 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 175: ICAN6 DNA로 명명된 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 176: 마우스로부터 리보솜 단백질 S18-코딩 서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 177: 마우스로부터 리보솜 단백질 S18-코딩 서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 178: 마우스로부터 트랜스페린 수용체 (TFR)-코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 179: 마우스로부터 트랜스페린 수용체 (TFR)-코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 180: 마우스로부터 간질세포 유래 인자 4 (Sdf4)-코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 181: 마우스로부터 간질세포 유래 인자 4 (Sdf4)-코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 182: 마우스로부터 세포질성 베타-액틴 코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 183: 마우스로부터 세포질성 베타-액틴 코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 184: 마우스로부터 오르니틴 데카복실라제-코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.
- 서열번호 185: 마우스로부터 오르니틴 데카복실라제-코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

서열번호 186: 마우스로부터 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 (HPRT)-코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

서열번호 187: 마우스로부터 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 (HPRT)-코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

서열번호 188: 마우스로부터 티로신 3-모노옥시게나제 코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

서열번호 189: 마우스로부터 티로신 3-모노옥시게나제 코딩-서열 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

서열번호 190: MCS-F로 명명된 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

서열번호 191: MCS-R로 명명된 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

서열번호 192: MF2N3(24)로 명명된 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 22 내지 24는 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.

서열번호 193: MR1N3(24)로 명명된 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 22 내지 24는 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.

서열번호 194: MTIS2F-16로 명명되는 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 14 내지 16은 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.

서열번호 195: MTIS2R-ACC로 명명되는 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머. '뉴클레오타이드 18 내지 20은 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.

서열번호 196: MTIS-PCR-F-2로 명명되는 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

서열번호 197: MTIS-PCR-R-2로 명명되는 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 일부를 증폭시키기 위한 작제된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

서열번호 198: SP6-HCV-F로 명명되는 HCV 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

서열번호 199: SP6-HCV-R로 명명되는 HCV 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

서열번호 200: HCV-A S로 명명되는 HCV 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 '뉴클레오타이드 18 내지 20은 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.

서열번호 201: HCV-A A로 명명되는 HCV 일부를 증폭시키기 위한 작제된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 '뉴클레오타이드 18 내지 20은 리보뉴클레오타이드이고 다른 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드이다'.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1

(a) 주형으로서 핵산, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, 스트랜드 치환 합성을 갖는 DNA 폴리머라제, 적어도 하나의 프라이머 및 RNase H를 혼합하여 반응 혼합물을 제조하고, 여기에서 프라이머는 주형으로서 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하고;

(b) 충분한 시간동안 반응 혼합물을 인큐베이션시켜 반응 산물을 생성시키는 것을 포함하는 핵산 증폭 방법.

##### 청구항 2

제 1항에 있어서, 반응 혼합물이 추가로 주형으로서 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동성인 서열을 갖는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 방법.

##### 청구항 3

(a) 주형으로서 핵산을 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 적어도 하나의 프라이머 및 DNA로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고 더불-스트랜드 핵산을 합성하고, 여기에서, 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하고;

(b) RNase H의 존재하에 스트랜드 치환 합성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 전 단계에서 수득된 주형으로서 더불-스트랜드 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시키고;

(c) 주형으로서 단계 (b)에서 수득한 더불-스트랜드 핵산을 단계 (b)에서 다시 사용하는 것을 포함하는 핵산 증폭 방법.

##### 청구항 4

(a) 주형으로서 핵산을 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 적어도 하나의 프라이머 및 DNA

폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고, 여기에서, 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 대옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하고;

(b) RNase H의 존재하에 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 전 단계에서 수득된 주형으로서 더블-스트랜드 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 치환된 스트랜드 및 더블-스트랜드 핵산을 합성하고;

(c) 단계 (b)에서 수득한 더블-스트랜드 핵산을 주형으로서 단계 (b)에서 다시 사용하고;

(d) 주형으로서 단계 (b)에서 수득한 치환된 스트랜드를 단계 (a)에서 사용된 것과 상이한 적어도 하나의 프라이머 및 DNA 폴리머라제로 처리하여 치환된 스트랜드에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고, 여기에서, 단계 (a)에서 사용된 것과 상이한 프라이머는 치환된 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 리보뉴클레오타이드, 및 대옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하고;

(e) RNase H의 존재하에 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 전 단계에서 수득된 주형으로서 더블-스트랜드 핵산에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 치환된 스트랜드 및 더블-스트랜드 핵산을 합성하고;

(f) 주형으로서 단계 (e)에서 수득한 더블-스트랜드 핵산을 단계 (e)에서 다시 사용하는 것을 포함하는, 적어도 두개의 프라이머를 사용하는 핵산 증폭 방법.

#### 청구항 5

제 3항 또는 제 4항에 있어서, DNA 폴리머라제가 스트랜드 치환 활성을 갖는 적어도 하나의 DNA 폴리머라제인 방법.

#### 청구항 6

(a) 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 두개의 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고, 여기에서 각 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 대옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하고;

(b) 단계 (a)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 사이트를 엔도뉴클레아제로 절단하고;

(c) 단계 (b)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드가 절단된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 주형 및 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하는 것을 포함하는 것을 핵산 증폭 방법.

#### 청구항 7

(a) 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 두개의 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고, 여기에서 각 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 대옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하고;

(b) 단계 (a)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 사이트를 엔도뉴클레아제로 절단하고;

(c) 단계 (b)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드가 절단된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 서로 어닐링된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하는 것을 포함하는 것을 핵산 증폭 방법.

#### 청구항 8

(a) 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 두개의 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고, 여기에서 각 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 대옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하고;

(b) 단계 (a)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 사이트를 엔도뉴클레아제로 절단하고;

(c) 단계 (b)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드가 절단된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 서로 어닐링된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드



핵산 및 단계 (a)의 두개의 프라이머가 어닐링된 서로 어닐링된 주형으로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고;

(d) 단계 (c)에서 수득한 두개의 프라이머가 어닐링된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 서로 어닐링된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산 및 단계 (a)의 두개의 프라이머가 어닐링된 서로 어닐링된 주형으로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고;

(e) 단계 (d)에서 수득한 두개의 프라이머가 어닐링된 더블-스트랜드 핵산을 단계 (d)에서 다시 사용하는 것을 포함하는 핵산 증폭 방법.

#### 형구항 9

(a) 주형으로서 더블-스트랜드 핵산을 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 두개의 프라이머 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로 처리하여 주형에 상보적인 프라이머-신장된 스트랜드를 합성하고 서로 어닐링하는 합성된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고, 여기에서 각 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단쪽에 위치하고;

(b) 단계 (a)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 사이트를 엔도뉴클레아제로 절단하고;

(c) 단계 (b)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드가 절단된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 서로 어닐링된 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산 및 단계 (a)의 두개의 프라이머가 어닐링된 서로 어닐링된 주형으로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고;

(d) 단계 (c)에서 수득한 두개의 프라이머가 어닐링된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 스트랜드 치환시키고 주형 및 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산을 수득하고;

(e) 단계 (d)에서 수득한 주형 및 프라이머-신장된 스트랜드로 구성된 더블-스트랜드 핵산의 리보뉴클레오타이드를 포함하는 사이트를 엔도뉴클레아제로 절단하고;

(f) 단계 (e)에서 수득한 프라이머-신장된 스트랜드가 절단된 더블-스트랜드 핵산의 각 프라이머 부위의 3'-말단으로부터 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 신장시켜 치환된 스트랜드를 합성하는 것을 포함하는 핵산 증폭 방법.

#### 형구항 10

제 6항 내지 제 10항중 어느 한 항에 있어서, 엔도뉴클레아제가 엔도리보뉴클레아제인 방법.

#### 형구항 11

제 10항에 있어서, 엔도리보뉴클레아제가 RNase H인 방법.

#### 형구항 12

제 1항 내지 제 5항 및 제 11항중 어느 한 항에 있어서, RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 싸모토가(*Thermotoga*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 싸무스(*Thermus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 미키오글루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H 및 바실러스(*Bacillus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

#### 형구항 13

제 1항 내지 제 12항중 어느 한 항에 있어서, 증폭시키고자 하는 핵산 부위의 길이가 200bp 이하인 방법.

#### 형구항 14

제 1항 내지 제 13항에 있어서, 하기 일반식으로 나타낸 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 방법:

일반식: 5'-dNa-Nb-dNc-3'

(a: 11이상의 정수; b: 10이상의 정수; c: 0 또는 10이상의 정수; dN: 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체; N: 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 리보뉴클레오타이드, 여기에서, dNa중 일부의 dNs는 Ns로 대체될 수 있고, 3'-말단의 뉴클레오타이드는 DNA 폴리머라제의 작용에 의한 3'-말단으로부터의 신장이 발생하지 않도록 변형될 수 있다).

#### 형구항 15

제 14항에 있어서, c가 0인 방법.

#### 형구항 16

제 14항 또는 제 15항에 있어서, 뉴클레오타이드 유사체가 데옥시리보이노신 뉴클레오타이드 또는 데옥시리보

우라실 뉴클레오티드이고 변형된 리보뉴클레오티드가 ( $\alpha$ -S) 리보뉴클레오티드인 방법.

#### 청구항 17

제 14항 내지 제 16항중 어느 한 항에 있어서, 제 14항 내지 제 16항중 어느 한 항에서 정의된 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머에 적절한 DNA 신장 반응 온도에서 DNA 신장 반응을 수행하는 방법.

#### 청구항 18

제 1항 내지 제 17항중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 프라이머에 어닐링하는 것을 촉진시키는 물질을 포함하는 어닐링 용액중에서 주형으로서 핵산을 핵산의 뉴클레오티드 서열에 실질적으로 상보적인 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머에 어닐링시키는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 19

제 18항에 있어서, 어닐링 용액이 스퍼미딘 및/또는 프로필렌디아민을 포함하는 방법.

#### 청구항 20

제 18항 또는 제 19항에 있어서, 주형으로서 핵산 및 핵산의 뉴클레오티드 서열에 실질적으로 상보적인 키메라성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하는 어닐링 용액을 90°C 이상에서 인큐베이션시킨 후 증폭 반응을 수행하는 온도 이하로 용액을 냉각시켜 어닐링을 수행하는 방법.

#### 청구항 21

제 1항 또는 제 20항중 어느 한 항에 있어서, 증폭 반응을 Bicine 및 HEPES로 구성된 그룹으로부터 선택되는 완충 성분을 포함하는 완충액중에서 수행하는 방법.

#### 청구항 22

제 1항 내지 제 21항중 어느 한 항에 있어서, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bst DNA 폴리머라제 및 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bca DNA 폴리머라제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 23

제 1항 내지 제 5항 및 제 11항 내지 제 22항중 어느 한 항에 있어서, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bca DNA 폴리머라제이고 RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 및 아키오플루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 24

제 23항에 있어서, RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H I형, 또는 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 또는 아키오플루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H II형인 방법.

#### 청구항 25

제 1항 내지 제 24항중 어느 한 항에 있어서, 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 사용되는 방법.

#### 청구항 26

제 25항에 있어서, DNA 폴리머라제가 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bca DNA 폴리머라제이고 Bca DNA 폴리머라제가 Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질의 존재하에 사용되는 방법.

#### 청구항 27

제 26항에 있어서, Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질이 망간 이온인 방법.

#### 청구항 28

제 1항 내지 제 27항중 어느 한 항에 있어서, 증폭 반응을 DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질의 존재하에 수행하는 방법.

#### 청구항 29

제 28항에 있어서, DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질이 포스포노프름산인 방법.

#### 청구항 30

제 1항 내지 제 29항중 어느 한 항에 있어서, 주형으로서 핵산인 싱글-스트랜드 DNA 또는 더블-스트랜드 DNA인 방법.

#### 청구항 31

제 30항에 있어서, 주형으로서 더블-스트랜드 DNA를 싱글-스트랜드 DNAs로 전환시킨 후 수행하는 방법.

#### 청구항 32

제 30항 또는 제 31항에 있어서, 주형으로서 핵산이 주형으로서 RNA를 사용하여 역전사 반응에 의해 수득된 cDNA인 방법.

#### 청구항 33

제 32항에 있어서, 주형으로서 RNA를 사용하여 역전사 반응에 의해 cDNA를 합성한 후 수행하는 방법.

#### 청구항 34

제 32항 또는 제 33항에 있어서, 역전사 효소 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 역전사 효소로 사용하는 방법.

#### 청구항 35

제 31항 내지 제 34항중 어느 한 항에 있어서, 역전사 반응 및 주형에 상보적인 신장된 스트랜드 합성을 역전사 효소 활성 및 스트랜드 치환 활성을 모두 갖는 하나의 DNA 폴리머라제를 사용하여 수행하는 방법.

#### 청구항 36

제 35항에 있어서, DNA 폴리머라제가 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bst DNA 폴리머라제 또는 바실러스 칼도넉스(*Bacillus caldolinear*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결합된 Bca DNA 폴리머라제인 방법.

#### 청구항 37

제 1항 내지 제 36항중 어느 한 항에 있어서, 핵산 증폭 반응을 등은 조건하에 수행하는 방법.

#### 청구항 38

제 1항 내지 제 37항중 어느 한 항에 있어서, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체의 존재하에 수행하는 방법.

#### 청구항 39

제 38항에 있어서, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체가 데옥시우리딘 트리포스페이트 또는 그의 유도체인 방법.

#### 청구항 40

(a) 주형으로서 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 적어도 하나의 프라이머, 여기에서, 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하고;

(b) 엔도뉴클레아제; 및

(c) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하는 핵산을 증폭시키기 위한 조성물.

#### 청구항 41

(a) 주형으로서 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 적어도 두개의 프라이머, 여기에서, 각 프라이머는 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치하고;

(b) 엔도뉴클레아제; 및

(c) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하는 핵산을 증폭시키기 위한 조성물.

#### 청구항 42

주형으로서 핵산, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제, 적어도 하나의 프라이머(여기에서, 프라이머는 주형으로서 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치한다) 및 엔도뉴클레아제를 혼합하여 수득된 핵산을 증폭시키기 위한 조성물.

#### 청구항 43

주형으로서 핵산, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제, 적어도 두개의 프라이머(여기에서, 각 프라이머는 주형으로서 더블-스트랜드 핵산의 각 스트랜드의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적이고 리보뉴클레오타이드, 및 데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함하는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 리보뉴클레오타이드는 프라이머의 3'-말단 또는 3'-말단측에 위치한다) 및 엔도뉴클레아제를 혼합하여

여 수득된 핵산을 증폭시키기 위한 조성물.

#### 청구항 44

제 40항 내지 제 43항중 어느 한 항에 있어서, 프라이머가 하기 일반식으로 나타난 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머인 조성물:

일반식: 5'-dNa-Nb-dNc-3'

(a: 10이상의 정수; b: 10이상의 정수; c: 0 또는 10이상의 정수; dN: 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체; N: 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 리보뉴클레오타이드, 여기에서, dNa중 일부의 dNs는 Ns로 대체될 수 있고, 3'-말단의 뉴클레오타이드는 DNA 폴리머라제의 작용에 의한 3'-말단으로부터의 신장이 발생하지 않도록 변형될 수 있다).

#### 청구항 45

제 44항에 있어서, c가 0인 조성물.

#### 청구항 46

제 44항 또는 제 45항에 있어서, 뉴클레오타이드 유사체가 데옥시리보아노신 뉴클레오타이드 또는 데옥시리보우라실 뉴클레오타이드이고 변형된 리보뉴클레오타이드가 ( $\alpha$ -S) 리보뉴클레오타이드인 조성물.

#### 청구항 47

제 40항 내지 제 46항중 어느 한 항에 있어서, 핵산 증폭 반응에 적절한 완충 성분을 포함하는 조성물.

#### 청구항 48

제 47항에 있어서, Bicine 및 HEPES로 구성된 그룹으로부터 선택되는 완충 성분을 포함하는 조성물.

#### 청구항 49

제 40항 내지 제 48항중 어느 한 항에 있어서, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편, 바실러스 스테아로테르모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bst DNA 폴리머라제 및 바실러스 할도테넥스(*Bacillus halodurans*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 DNA 폴리머라제가 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로서 사용되는 조성물.

#### 청구항 50

제 40항 내지 제 49항중 어느 한 항에 있어서, 엔도뉴클레아제가 엔도리보뉴클레아제인 조성물.

#### 청구항 51

제 50항에 있어서, 엔도리보뉴클레아제가 RNase H인 조성물.

#### 청구항 52

제 51항에 있어서, RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 싸모토가(*Thermotoga*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 싸무스(*Therms*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 및 아키오글로부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H 및 바실러스(*Bacillus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

#### 청구항 53

제 40항 내지 제 52항중 어느 한 항에 있어서, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 바실러스 할도테넥스(*Bacillus halodurans*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제이고 엔도뉴클레아제가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 및 아키오글로부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 RNase H인 조성물.

#### 청구항 54

제 53항에 있어서, RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H I형, 또는 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 또는 아키오글로부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H II형인 조성물.

#### 청구항 55

제 40항 내지 제 54항중 어느 한 항에 있어서, 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 사용되는 조성물.

#### 청구항 56

제 55항에 있어서, DNA 폴리머라제가 바실러스 할도테넥스(*Bacillus halodurans*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제이고 Bca DNA 폴리머라제가 Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질을 포함하는 조성물.

#### 청구항 57

제 56항에 있어서, Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질이 망간 이온인 조성물.

#### 청구항 58

제 40항 내지 제 57항중 어느 한 항에 있어서, DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질을 포함하는 조성물.

#### 청구항 59

제 58항에 있어서, DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질이 포스포노포름산인 조성물.

#### 청구항 60

제 40항 내지 제 59항중 어느 한 항에 있어서, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 61

제 60항에 있어서, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체가 데옥시우리딘 트리포스페이트 또는 그의 유도체인 조성물.

#### 청구항 62

(a) RNase H; 및

(b) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하는, 제 1항 내지 제 5항중 어느 한 항에 정의된 핵산을 증폭시키는 방법을 위해 사용되는 핵산을 증폭시키기 위한 조성물.

#### 청구항 63

(a) 엔도뉴클레아제; 및

(b) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하는 제 6항 내지 제 9항중 어느 한 항에 정의된 핵산을 증폭시키는 방법을 위해 사용되는 핵산을 증폭시키기 위한 조성물.

#### 청구항 64

제 63항에 있어서, 엔도뉴클레아제가 엔도리보뉴클레아제인 조성물.

#### 청구항 65

제 64항에 있어서, 엔도리보뉴클레아제가 RNase H인 조성물.

#### 청구항 66

제 62항 또는 제 65항에 있어서, RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 썬모토가(*Thermotoga*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 썬무스(*Thermus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 아키오클루부스(*Aerchaeglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H 및 바실러스(*Bacillus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

#### 청구항 67

제 62항 내지 제 66항중 어느 한 항에 있어서, 핵산 증폭 반응에 적절한 완충 성분을 포함하는 조성물.

#### 청구항 68

제 67항에 있어서, Bicine 및 HEPES로 구성된 그룹으로부터 선택되는 완충 성분을 포함하는 조성물.

#### 청구항 69

제 62항 내지 제 68항중 어느 한 항에 있어서, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 1의 클레나우(Klenow) 단편, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 절편된 Bst DNA 폴리머라제 및 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 절편된 Bca DNA 폴리머라제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 DNA 폴리머라제가 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로서 사용되는 조성물.

#### 청구항 70

제 62항에 있어서, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 절편된 Bca DNA 폴리머라제이고 RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 및 아키오클루부스(*Aerchaeglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 조성물.

#### 청구항 71

제 62항에 있어서, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 절편된 Bca DNA 폴리머라제이고 엔도뉴클레아제가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 및 아키오클루부스(*Aerchaeglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는

조성물.

#### 청구항 72

제 62 항 내지 제 71항중 어느 한 항에 있어서, 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 사용되는 조성물.

#### 청구항 73

제 72항에 있어서, DNA 폴리머라제가 바실러스 할도데넥스(*Bacillus halodurans*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제이고 Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질을 포함하는 조성물.

#### 청구항 74

제 73항에 있어서, Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질이 망간 미온인 조성물.

#### 청구항 75

제 62항 내지 제 74항중 어느 한 항에 있어서, DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질을 포함하는 물질을 포함하는 조성물.

#### 청구항 76

제 75항에 있어서, DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질이 포스포노포름산인 조성물.

#### 청구항 77

제 62항 내지 제 76항중 어느 한 항에 있어서, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 78

제 77항에 있어서, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체가 데옥시우리딘 트리포스페이트 또는 그의 유도체인 조성물.

#### 청구항 79

(a) RNase H; 및

(b) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하고, 제 1항 내지 제 5항중 어느 한 항에서 정의된 핵산을 증폭시키기 위한 방법에서 사용되는 핵산을 증폭시키기 위한 키트.

#### 청구항 80

(a) 엔도뉴클레아제; 및

(b) 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 포함하고, 제 6항 내지 제 9항중 어느 한 항에서 정의된 핵산을 증폭시키기 위한 방법에서 사용되는 핵산을 증폭시키기 위한 키트.

#### 청구항 81

제 80항에 있어서, 엔도뉴클레아제가 엔도리보뉴클레아제인 키트.

#### 청구항 82

제 81항에 있어서, 엔도리보뉴클레아제가 RNase H인 키트.

#### 청구항 83

제 79항 또는 제 82항에 있어서, RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 썬모토가(*Thermotoga*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 썬무스(*Thermus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 아키오글루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H 및 바실러스(*Bacillus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 키트.

#### 청구항 84

제 79항 내지 제 83항중 어느 한 항에 있어서, 핵산 증폭 반응에 적절한 완충 성분을 포함하는 키트.

#### 청구항 85

제 84항에 있어서, Bicine 및 HEPES로 구성된 그룹으로부터 선택되는 완충 성분을 포함하는 키트.

#### 청구항 86

제 79항 내지 제 85항중 어느 한 항에 있어서, 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상보적인 프라이머에 주형으로서의 핵산이 어닐링하는 것을 촉진시키는 물질을 포함하는 어닐링 용액을 포함하는 키트.

#### 청구항 87

제 86항에 있어서, 머닐링 용액이 스퍼미딘 및/또는 프로필렌디아민을 포함하는 키트.

#### 청구항 88

제 79항 내지 제 87항중 어느 한 항에 있어서, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 1의 클레나우(Klenow) 단편, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bst DNA 폴리머라제 및 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 DNA 폴리머라제가 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제로서 사용되는 키트.

#### 청구항 89

제 79항에 있어서, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제이고 RNase H가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 및 아키오글루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 키트.

#### 청구항 90

제 80항에 있어서, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제이고 엔도뉴클레아제가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 RNase H, 피로코쿠스(*Pyrococcus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H, 및 아키오글루부스(*Archaeoglobus*) 속 박테리움으로부터의 RNase H로 구성된 그룹으로부터 선택되는 키트.

#### 청구항 91

제 89 항 또는 제 90에 있어서, 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 사용되는 조성물.

#### 청구항 92

제 79항 내지 제 91항중 어느 한 항에 있어서, 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 사용되는 키트.

#### 청구항 93

제 92항에 있어서, DNA 폴리머라제가 바실러스 칼도테넥스(*Bacillus caldofenax*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제이고 Bca DNA 폴리머라제가 Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질을 포함하는 키트.

#### 청구항 94

제 93항에 있어서, Bca DNA 폴리머라제의 엔도뉴클레아제 활성이 발현될 수 있도록 하는 물질이 망간 이온인 키트.

#### 청구항 95

제 79항 내지 제 94항중 어느 한 항에 있어서, DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질을 포함하는 키트.

#### 청구항 96

제 95항에 있어서, DNA 폴리머라제의 역전사 활성을 저해하는 물질이 포스포노포름산인 키트.

#### 청구항 97

제 79항 내지 제 96항중 어느 한 항에 있어서, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체를 포함하는 키트.

#### 청구항 98

제 97항에 있어서, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 유사체가 데옥시우리딘 트리포스페이트 또는 그의 유도체인 키트.

#### 청구항 99

패키지 형태(packaged form)이고 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제 및 RNase H의 사용을 지시하는 안내서를 포함하는, 제 1항 내지 제 5항중 어느 한 항에 따른 핵산 증폭 방법을 위해 사용되는 핵산 증폭용 키트.

#### 청구항 100

패키지 형태이고 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제 및 엔도뉴클레아제의 사용을 지시하는 안내서를 포함하는, 제 6 내지 제 9항중 어느 한 항에 따른 핵산 증폭 방법을 위해 사용되는 핵산 증폭용 키트.

#### 청구항 101

포장재 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제 및/또는 RNase H를 포함하는, 포장재에 동봉된 핵산을 증폭시키기 위한 시약으로 구성되고, 핵산을 증폭시키기 위한 시약을 담은 조건하에서의 핵산 증폭

을 위해 사용할 수 있다는 설명이 포장재에 부착된 라벨 또는 포장재에 첨부된 안내서에 표시된 핵산 증폭을 위한 시약 제품.

#### 청구항 102

포장재 및 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제 및/또는 엔도뉴클레아제를 포함하는, 포장재에 등용된 핵산을 증폭시키기 위한 시약으로 구성되고, 핵산을 증폭시키기 위한 시약을 등온 조건하에서의 핵산 증폭을 위해 사용할 수 있다는 설명이 포장재에 부착된 라벨 또는 포장재에 첨부된 안내서에 표시된 핵산 증폭을 위한 시약 제품.

#### 청구항 103

- (a) 제 1항 내지 제 39항중 어느 한 항에 정의된 핵산 증폭 방법에 의해 핵산을 증폭시키고;
- (b) 단계 (a)에서 증폭된 표적 핵산을 검출하는 것을 포함하는, 샘플중 표적 핵산을 검출하는 방법.

#### 청구항 104

제 103항에 있어서, 검출용 프로브를 사용하여 증폭된 핵산을 검출하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 105

제 104항에 있어서, 검출용 프로브가 표지화 물질로 표지된 프로브인 방법.

#### 청구항 106

제 105항에 있어서, 프로브가 소광 상태에 이르게 하는 거리에 위치하는 두개 이상의 형광 물질로 표지된 RNA 프로브인 방법.

#### 청구항 107

제 103항 내지 제 106항중 어느 한 항에서 정의된 표적 핵산 검출 방법을 위해 사용되는 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 108

제 107항에 있어서, 하기 일반식으로 나타낸 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머:

일반식: 5'-dNa-Nb-dNc-3'

(a: 11이상의 정수; b: 1이상의 정수; c: 0 또는 1이상의 정수; dN: 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체; N: 변형되지 않은 리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 리보뉴클레오타이드, 여기에서, dNa중 일부의 dNs는 Ns로 대체될 수 있고, 3'-말단의 뉴클레오타이드는 DNA 폴리머라제의 작용에 의한 3'-말단으로부터의 신장이 발생하지 않도록 변형될 수 있다).

#### 청구항 109

제 108항에 있어서, c가 0인 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 110

제 108항 또는 제 109항에 있어서, 뉴클레오타이드 유사체가 데옥시리보이노신 뉴클레오타이드 또는 데옥시리보우라실 뉴클레오타이드이고 변형된 리보뉴클레오타이드가 ( $\alpha$ -S) 리보뉴클레오타이드인 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 111

제 107항 내지 제 110항중 어느 한 항에 있어서, 병원성 미생물 또는 질환-관련 유전자 검출을 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 112

제 111항에 있어서, 병원성 미생물이 장염성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 인간 유두종 바이러스(human papilloma virus), C형 간염 바이러스 또는 비로이드인 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 113

서열번호 31-34, 47, 48, 51-53, 64-72, 84, 85, 113, 114, 130 및 131로 구성된 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 장염성 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 114

서열번호 59, 60, 119, 120, 122 및 123로 구성된 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 비로이드를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 115

서열번호 116 또는 117로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium*



*botulinum*)를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 116

서열번호 96 또는 97로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 인간 유두종 바이러스를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 117

서열번호 101, 102, 138, 139, 200 및 201로 구성된 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 C형 간염 바이러스를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 118

서열번호 136 또는 137로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 스타필로코쿠스 마우레우스(*Staphylococcus aureus*)를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 119

서열번호 155, 156, 159-162, 194 및 195로 구성된 그룹으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 120

서열번호 157 또는 158로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 클라미디아(*Chlamydia*)를 검출하기 위한 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머.

#### 청구항 121

제 107항 내지 제 120항중 어느 한 항에 정의된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는, 제 1항 내지 제 39항중 어느 한 항에 정의된 핵산을 증폭하는 방법에서 사용되는 핵산 증폭용 키트.

#### 청구항 122

제 107항 내지 제 120항중 어느 한 항에 정의된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는, 제 103항 내지 제 106항중 어느 한 항에 정의된 표적 핵산을 검출하는 방법에서 사용되는 핵산 검출용 키트.

#### 청구항 123

제 103항 내지 제 106항중 어느 한 항에서 정의된 방법에서 사용되는 프로브.

#### 청구항 124

제 1항 내지 제 39항중 어느 한 항에서 정의된 방법에 의해 증폭된 핵산에 하이브리드화되는 프로브.

#### 청구항 125

제 113항 내지 제 120항중 어느 한 항에서 정의된 키메라성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 증폭된 부위에 하이브리드화되는 프로브.

#### 청구항 126

제 123항 내지 제 125항중 어느 한 항에 있어서, 표지 물질로 표지된 프로브.

#### 청구항 127

제 126항에 있어서, 소량 상태에 이르게 하는 거리에 위치하는 두개 이상의 형광 물질로 표지된 RNA 프로브인 프로브.

#### 청구항 128

제 123항 내지 제 127항중 어느 한 항에서 정의된 프로브를 포함하는 제 103항 내지 제 106항중 어느 한 항에서 정의된 방법에서 사용되는 키트.

#### 청구항 129

스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 주형 스위치 반응을 시키는 것을 포함하는, 핵산 증폭 방법.

#### 청구항 130

제 129항에 있어서, 스트랜드 치환 활성을 갖는 DNA 폴리머라제가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)로부터의 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bst DNA 폴리머라제 및 바실러스 할도테넥스(*Bacillus halodurans*)로부터의 5'→3' 엑소뉴클레아제 결핍된 Bca DNA 폴리머라제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 131

(a) 제 1항 내지 제 39항중 어느 한 항에 의해 정의된 핵산 증폭 방법에 의해 고정화하고자 하는 핵산을

증폭시키고;

(b) 단계 (a)에서 증폭된 핵산을 미리 정해진 영역에 배열하고 고정화시키는 것을 포함하는, 핵산이 미리 정해진 영역에 배열된, 고정화된 핵산을 갖는 물질을 제조하는 방법.

#### 청구항 132

제 131항에 따른 방법에 의해 제조되는 핵산이 미리 정해진 영역에 배열된, 고정화된 핵산을 갖는 물질.

#### 청구항 133

(a) 제 1항 내지 제 39항중 어느 한 항에 의해 정의된 핵산 증폭 방법에 의해 핵산을 증폭시키고;

(b) 단계 (a)에서 증폭된 핵산을 모으는 것을 포함하는, 핵산을 대량으로 생산하는 방법.

#### 청구항 134

(a) 증폭시키고자 하는 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA를 복제하여 주형으로서 핵산을 제조하고;

(b) 제 1항 내지 제 39항중 어느 한 항에 의해 정의된 핵산 증폭 방법에 의해 단계 (a)에서 수득한 주형으로서 핵산을 증폭시키는 것을 포함하는 핵산 증폭 방법.

#### 청구항 135

제 1항 내지 제 39항, 제 133항 및 134항중 어느 한 항에 의해 정의된 방법에 따라 핵산을 증폭시키는 것을 포함하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열 결정 방법.

#### 청구항 136

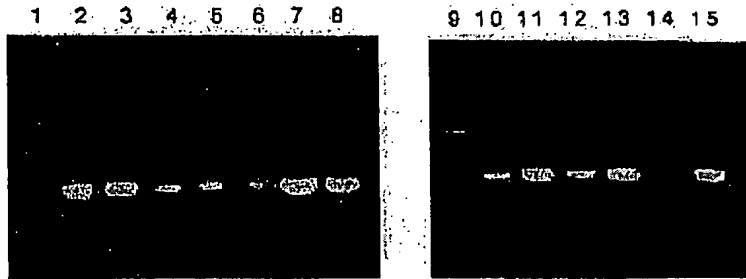
제 1항 내지 제 39항중 어느 한 항에 의해 정의된 방법을 사용하여 싱글-스트랜드 핵산을 제조하는 것을 포함하는 싱글-스트랜드 핵산을 제조하는 방법.

#### 청구항 137

제 136항에 있어서, 적어도 두개의 프라이머가 상이한 농도로 사용되는 방법.

#### 도면

##### 도면1

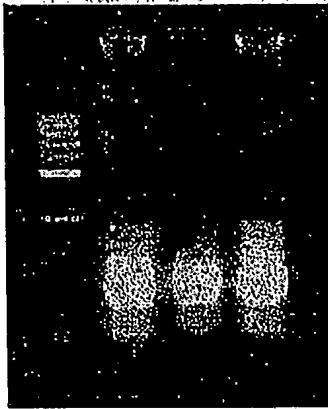


##### 도면2



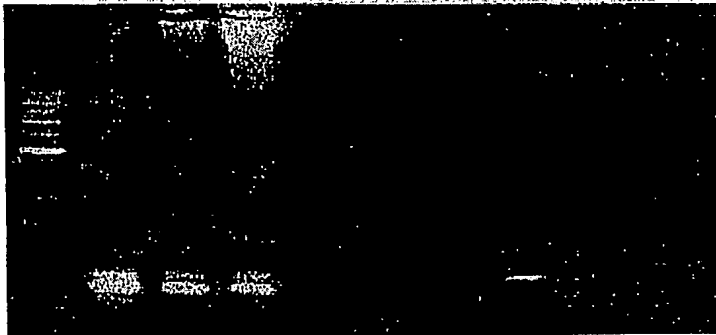
도 3

1 2 3 4



도 4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

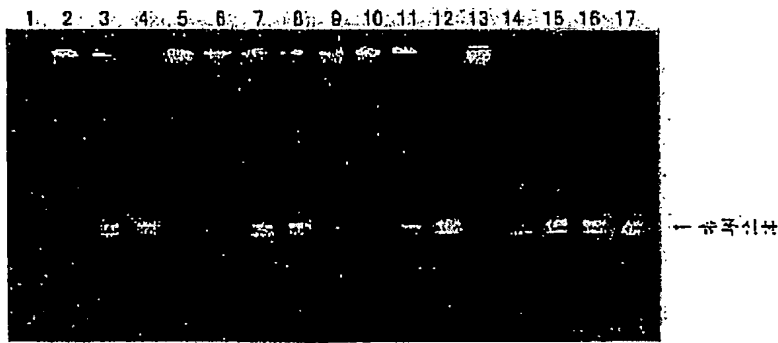


도 5

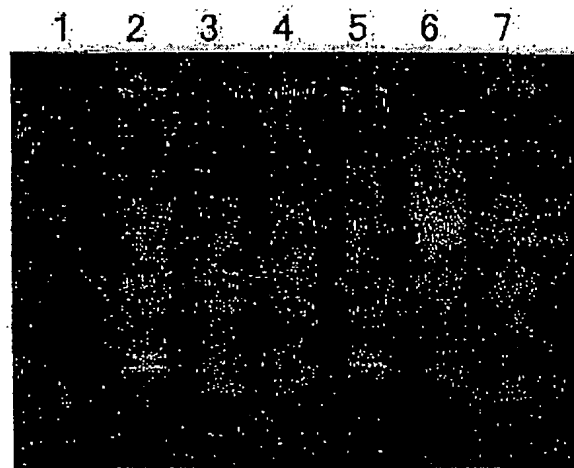
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



도 16



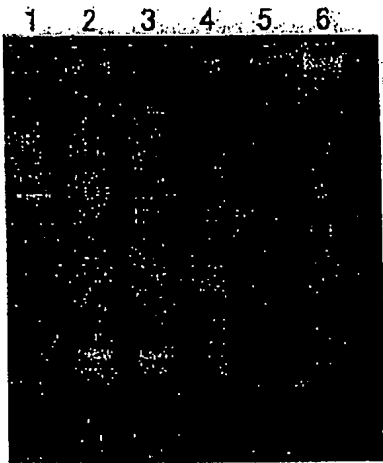
도 17



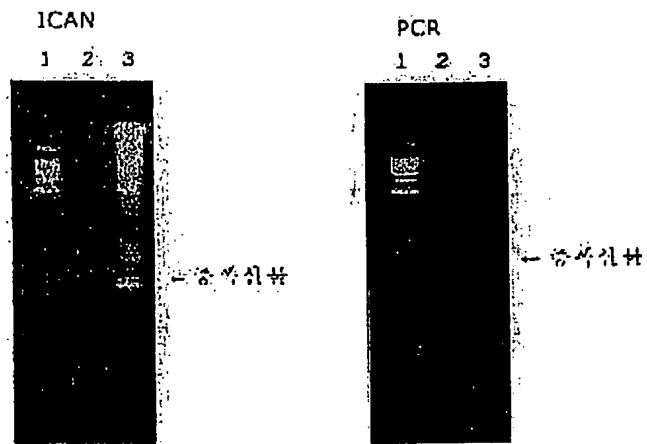
도 18



도 9



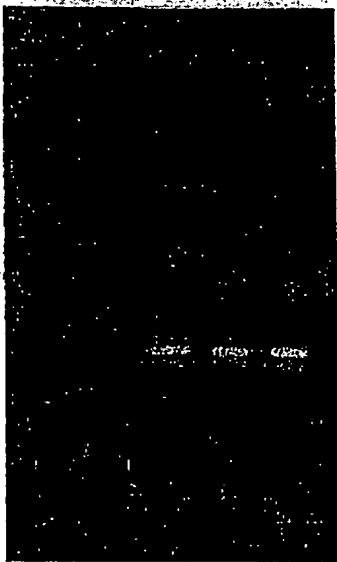
도 10



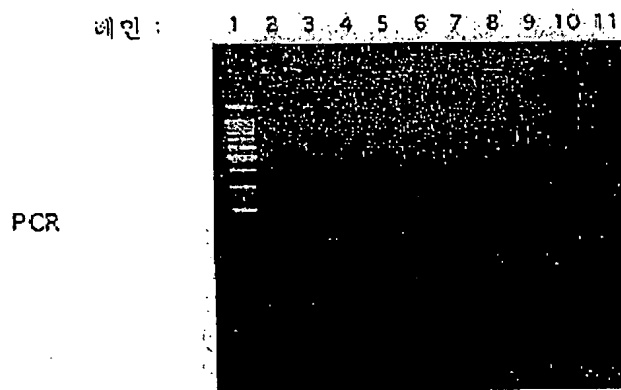
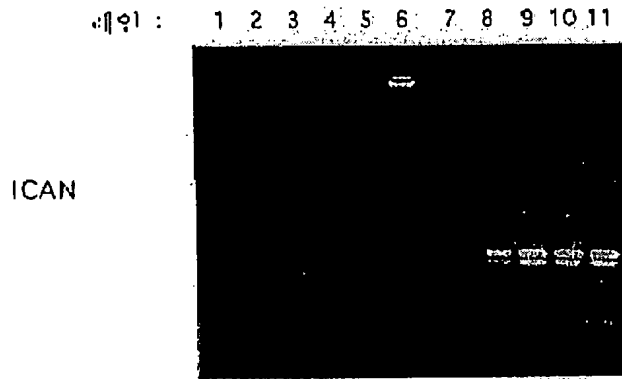
도면 11

레인:

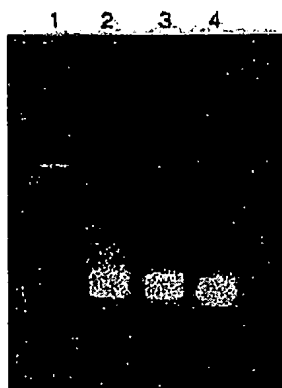
1 2 3 4 5



도면 12



도면 13



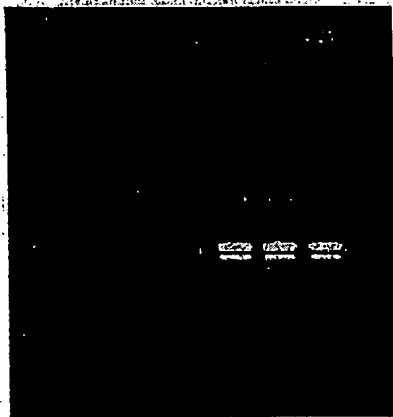
도면 14

예인 : 1 2 3 4 5



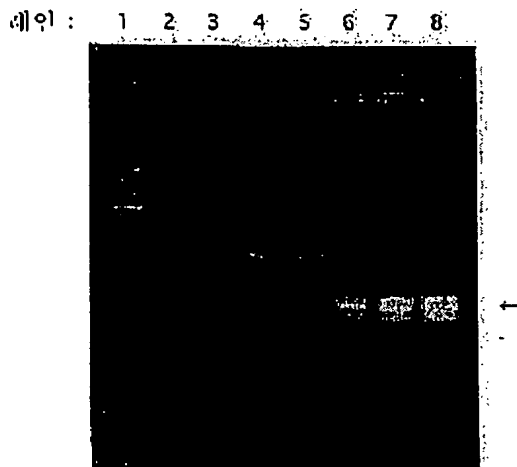
도면 15

예인 : 1 2 3 4 5 6 7

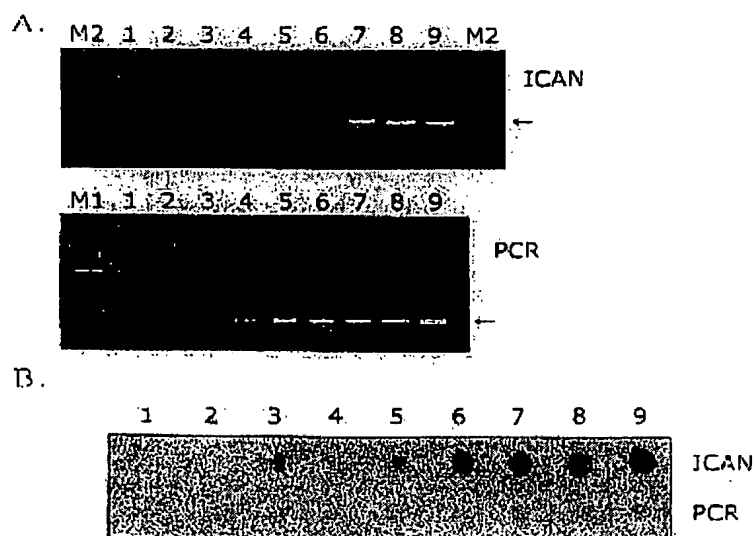




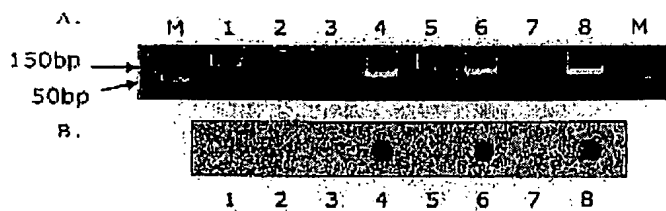
도면 16



도면 17



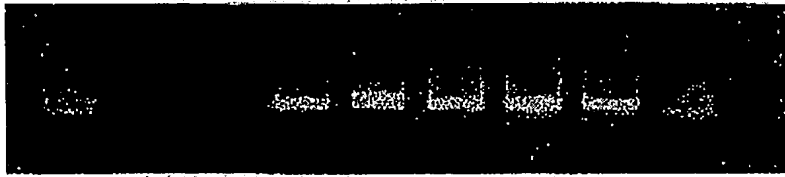
도면 18



도 19

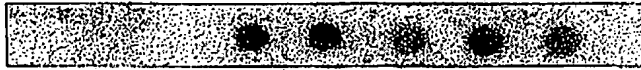
A.

M B 1 2 3 4 5 6 M



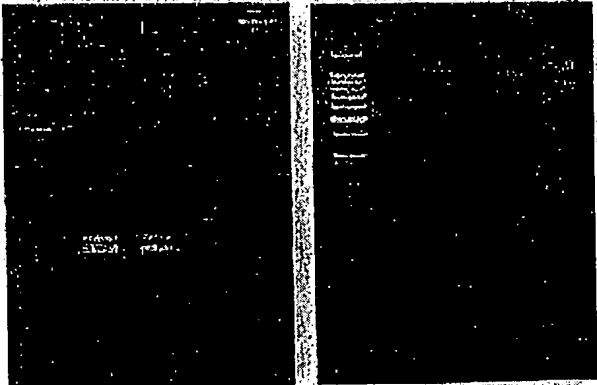
B.

B 1 2 3 4 5 6

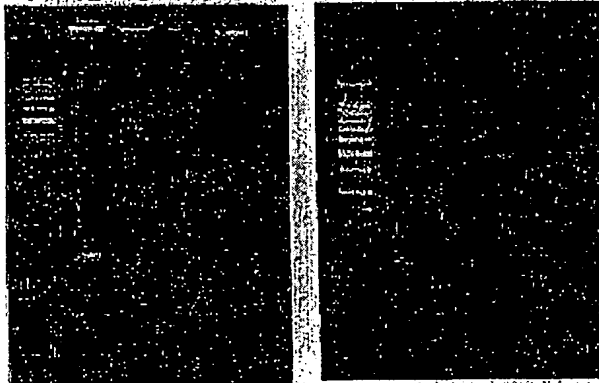


도 20

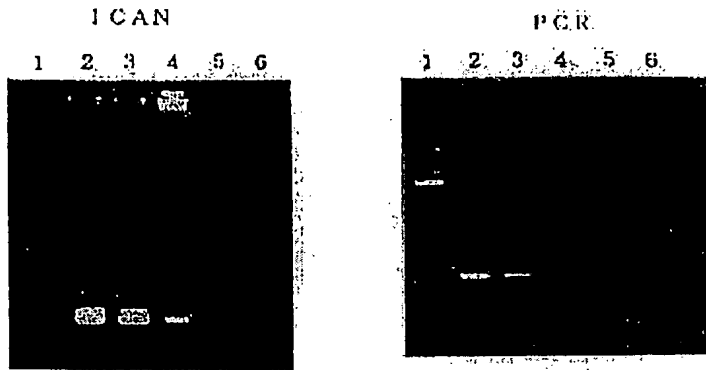
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



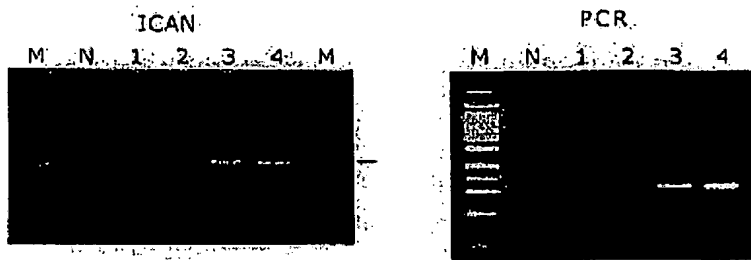
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



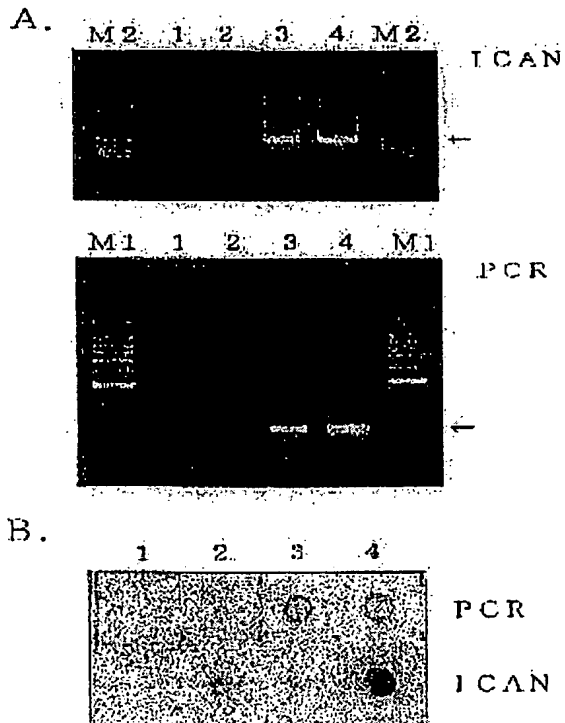
도 21



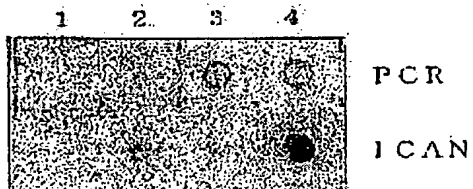
도 22



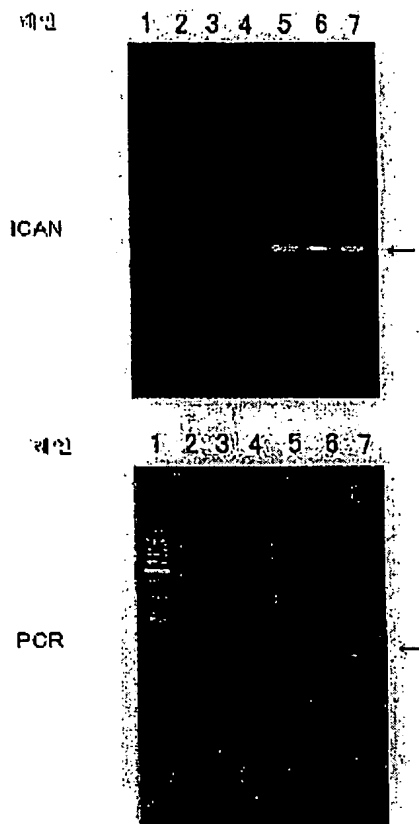
도 23



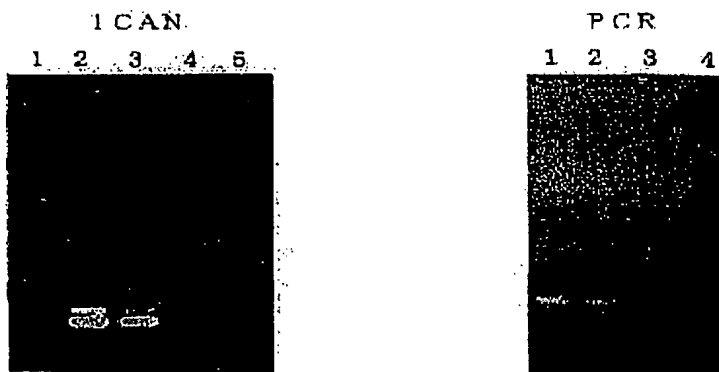
B.



도 24



도 25



5.2.23

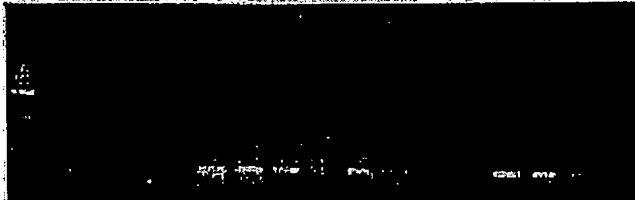
ICAN

1 2 3 4 5 6 7 8 9



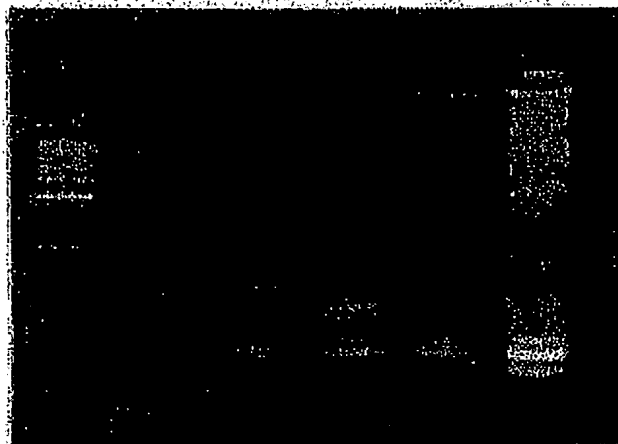
PQR

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

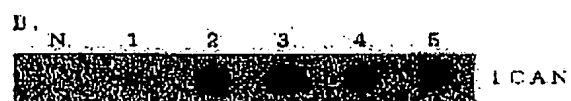
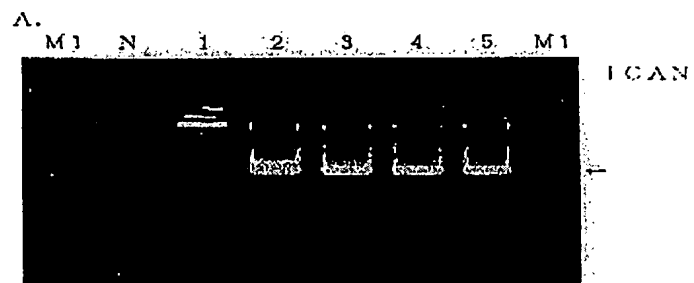


5.2.27

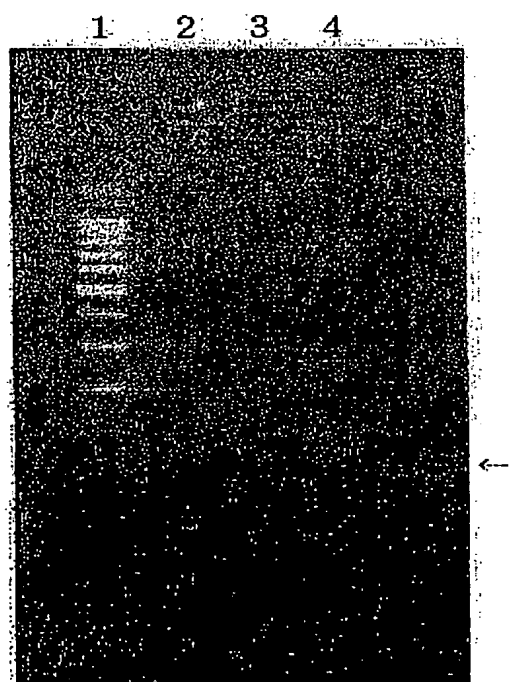
M N 1 2 3 4

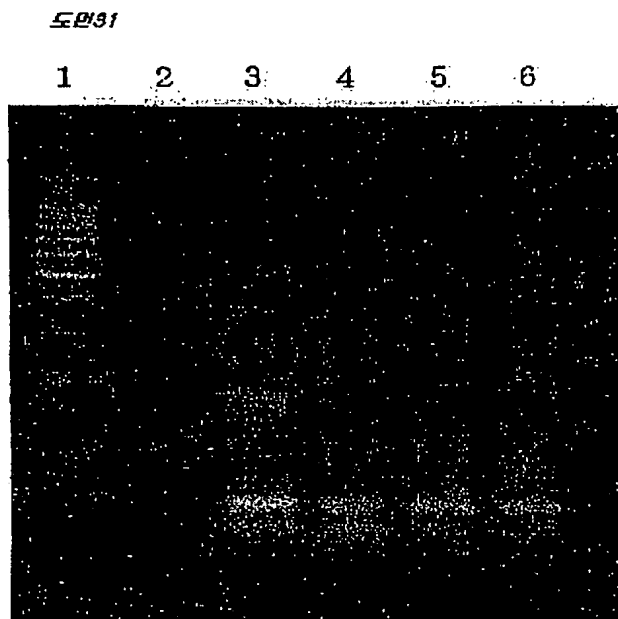
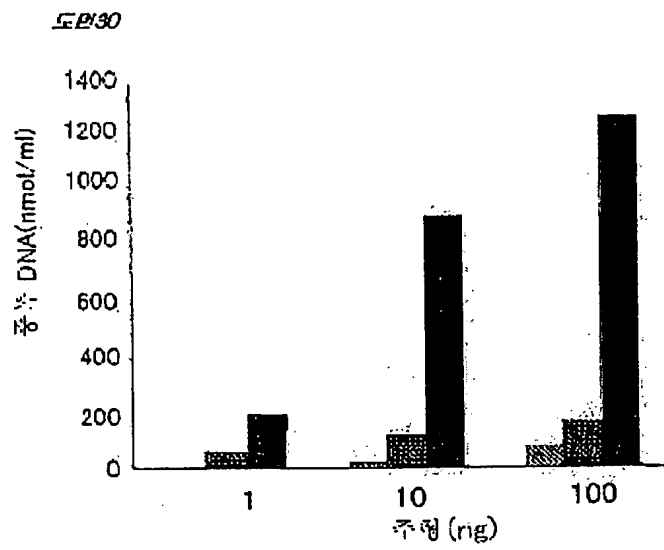


5020

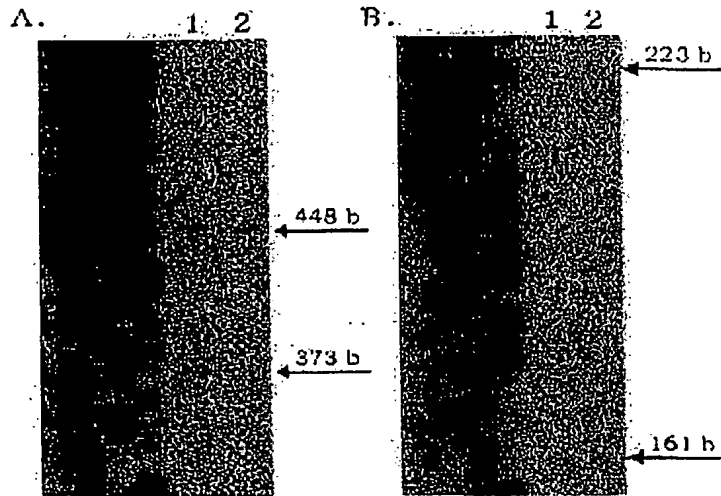


5020

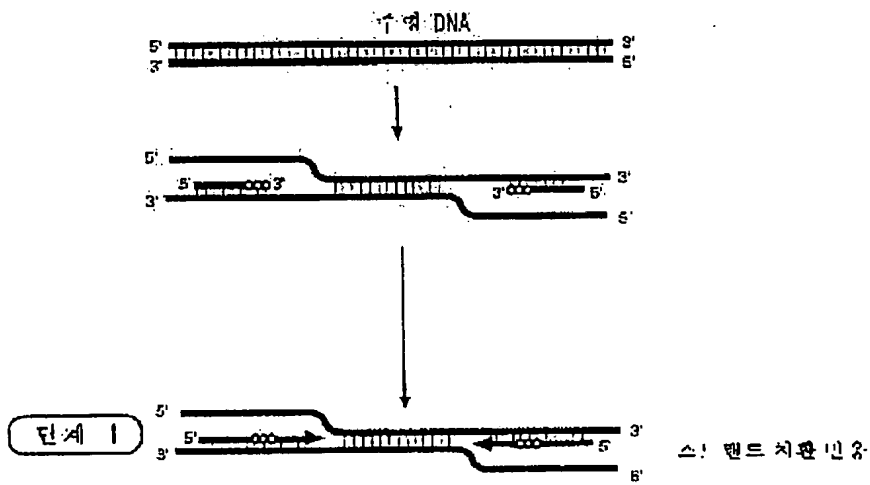




도 32

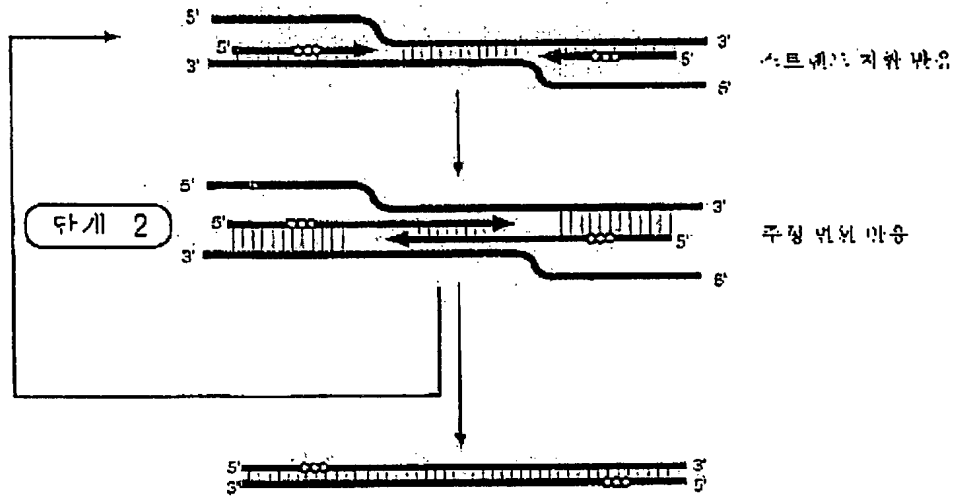


도 33

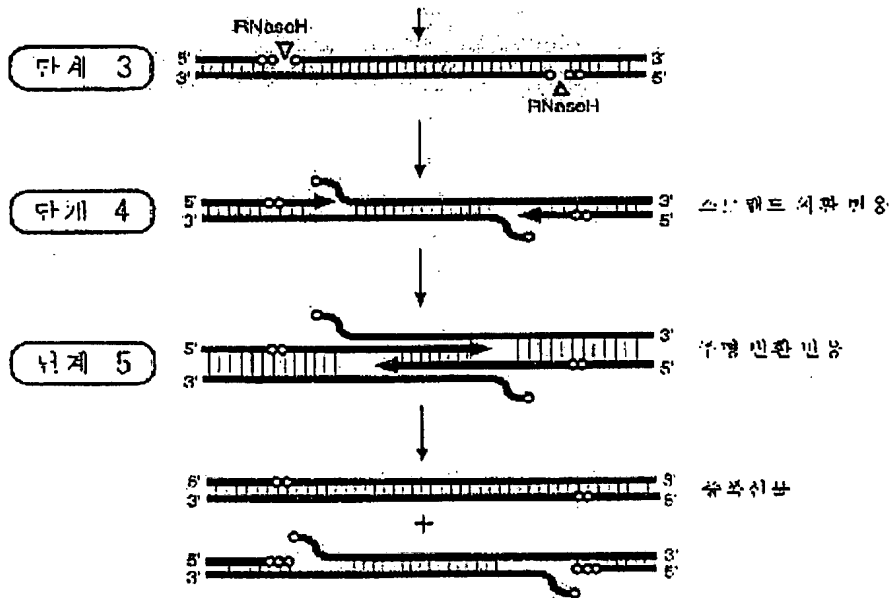




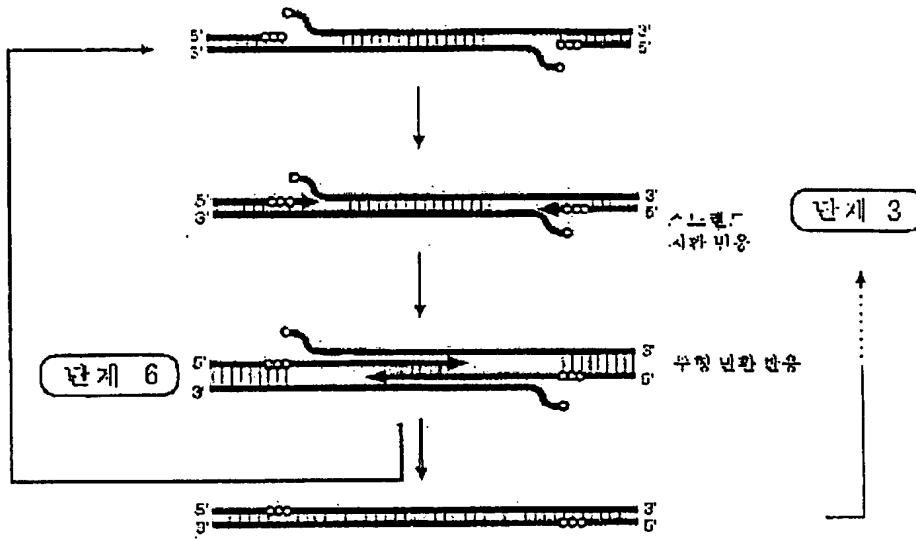
도면34



도면35



도면 36



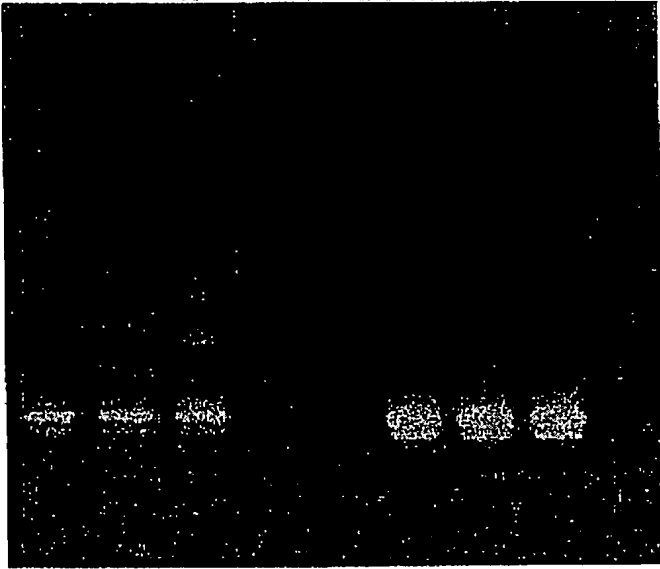
도면 37

M 1 2 3 4 5 6 7



도판 30

1 2 3 4 M 5 6 7 8



도판 30

M 1 2 3 4 5 6

